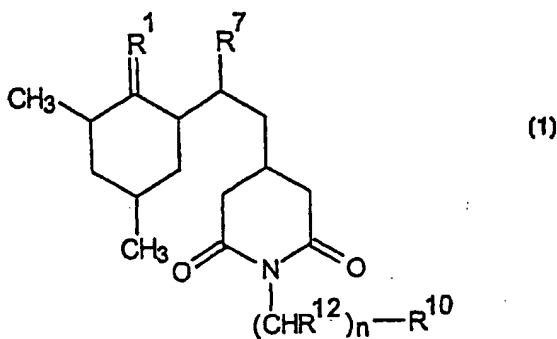




PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C07D 211/88, A61K 31/45, C07K 5/06</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/26188</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Mai 2000 (11.05.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/08267</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 29. Oktober 1999 (29.10.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 50 167.6 30. Oktober 1998 (30.10.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE). HANS-KNÖLL-INSTITUT FÜR NATURSTOFF FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FISCHER, Gunter [DE/DE]; Otto-Kanning-Strasse 11, D-06120 Halle (DE). KÜLLERTZ, Gerhard [DE/DE]; Richard-Paulick-Strasse 14, D-06124 Halle (DE). CHRISTNER, Claudia [DE/DE]; Wilhelm-Stade-Strasse 4, D-07749 Jena (DE). WYRWA, Ralf [DE/DE]; Burgstrasse 47, D-07751 Oelknitz (DE). GRABLEY, Susanne [DE/DE]; Hügelstrasse 36, D-65770 Kelkheim (DE). THIERICKE, Ralf [DE/DE]; Rathenaus- trasse 3, D-07745 Jena (DE).</p>		
<p>(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</p>		
<p>(54) Title: CYCLOHEXIMIDE DERIVATIVES WHICH INFLUENCE THE REGENERATION OF NEURAL TISSUE</p> <p>(54) Bezeichnung: CYCLOHEXIMID-DERIVATE, DIE DIE REGENERATION VON NERVENGEWEBE BEEINFLUSSEN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to novel compounds of general formula (1) in which n represents a whole number ranging from 1 to 20; each R¹² independently represents a hydrogen atom or an alkyl radical; R¹ is selected from an oxygen atom, from a sulfur atom or from the groups NR², NOR² and N-NR²R³; R⁷ represents a radical -OH, OR⁹, -OC(O)R⁹, -OC(S)R⁹, -OC(O)NHR⁹, -OC(S)NHR⁹ or O(CHR¹²)_nR¹⁰, and; R¹⁰ represents a radical -NHR², -NR²R³, -C(O)OR², -C(S)OR², -C(O)NR²R³, -CN, NR²C(O)NR²R³, -OC(O)NR²R³, -NR²C(S)NR²R³, -OC(S)NR²R³ or C(O)NHR¹¹. The inventive compounds are capable of influencing the regeneration of neural tissue. The invention also relates to pharmaceutical compositions containing compounds of this type and to the use thereof for treating defective neural tissue.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Beschrieben werden neue Verbindungen der allgemeinen Formel (1), in der n eine ganze Zahl von 1 bis 20 bedeutet, jedes R¹² unabhängig ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest bedeutet, R¹ aus einem Sauerstoffatom, einem Schwefelatom oder den Gruppen NR², NOR² und N-NR²R³ ausgewählt wird, R⁷ einen Rest -OH, OR⁹, -OC(O)R⁹, -OC(S)R⁹, -OC(O)NHR⁹, -OC(S)NHR⁹ oder O(CHR¹²)_nR¹⁰ darstellt, und R¹⁰ einen Rest -NHR², -NR²R³, -C(O)OR², -C(S)OR², -C(O)NR²R³, -CN, NR²C(O)NR²R³, -OC(O)NR²R³, -NR²C(S)NR²R³, -OC(S)NR²R³ oder C(O)NHR¹¹ darstellt, die in der Lage sind, die Regeneration von Nervengewebe zu beeinflussen, ebenso wie pharmazeutische Zusammensetzungen, die solche Verbindungen enthalten, und deren Anwendung zur Behandlung von defektem Nervengewebe.</p>		



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Cycloheximid-Derivate, die die Regeneration von Nervengewebe beeinflussen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Cycloheximid-Derivate und pharmakologisch verträgliche Salze davon, die die Regeneration von Nervengewebe bei Säugetieren beeinflussen, sowie pharmazeutische Zusammensetzungen die solche Verbindungen enthalten. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der vorgenannten Verbindungen zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von beschädigten Nervenzellen.

Um Nervenwachstumsfaktoren zu finden besteht eine der Strategien darin, die Prozesse zu beschreiben, die während des Wachstums von Nervenzellgewebe ablaufen. Insbesondere wird versucht die teilnehmenden Stoffe (Faktoren, Rezeptoren) molekular zu charakterisieren. Darauf aufbauend wird in entsprechenden Nervenzellwachstumstests untersucht ob Konzentrationsveränderungen dieser Stoffe mit Nervenzellwachstum einher geht. So wurde z.B. für Nervenwachstumsfaktor NGF (Hutsai, J. Neurosc. Res. 39 (1994), 634-645) und seine möglichen Rezeptoren trka und p75(NGFR) (Maeda, Molekular Brain Research 37 (1996), 166-174), als auch für das Neuropeptid Galanin und ein vasoaktives intestinales peptid (VIP) (Klimaschewski, Neurosc. Letter 195 (1995), 133-136) eine solche Beziehung gefunden. Ein Einfluß auf die Nervenzellgeweberegeneration (maximal etwa 10%) konnte im PC12-Zell-Modell nur für VIP, nicht aber für Galanin gefunden werden. Auch für die Verbindung Veratrylguanidinmethansulfonat (VGT) konnte eine Stimulation der Regeneration von defekten Nervengewebe

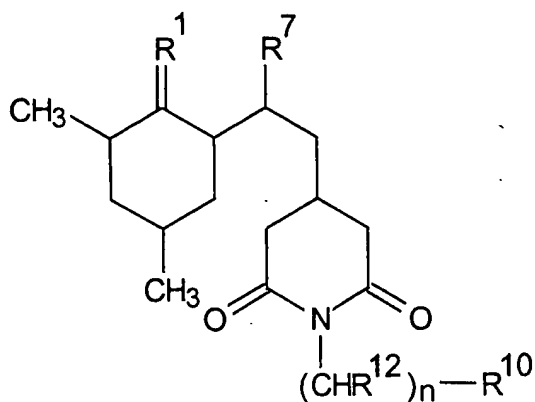
nachgewiesen werden. Der Effekt war vergleichbar mit der Wirkung von NGF (Becherer, Neurochem. Int. 26 (1995), 245-254).

Zu einem neuen Ansatz in der Suche nach Nervenzellwachstumsfaktoren führte die Entdeckung, daß die Konzentrationen von FKBP12 mRNA nach Läsionen von Nervengewebe sehr stark erhöht sind (Lyons, J. Neurosc. 15 (1995), 2985-2994), und daß die Gabe von FKBP12-Inhibitoren die bisher bekannten NGF-Effekte um einen Faktor von etwa 100 erhöht. Da FKBP12-Inhibitoren wie FK506, und seine therapeutischen Effekte, insbesondere seine Nebenwirkungen umfangreich bekannt waren, führte diese Entdeckung zur Suche nach FKBP12-Inhibitoren, von denen therapeutisch nutzbare Nervenregenerationseffekte ausgehen, die aber nicht die nachteiligen Nebenwirkungen der bekannten FKBP12-Inhibitoren aufweisen. Eine Übersicht über solche bekannten Inhibitoren ist z.B. in Hamilton G.S. and Steiner, J.P. Current Pharmac. Design 3 (1997), 405-428 zusammenfassend dargestellt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Verbindungen zur Verfügung zu stellen, die für die Therapie von Nervendegenerationskrankheiten verwendet werden können, ohne daß toxische Nebenwirkungen in Zellen, insbesondere beim Menschen verursacht werden.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Cycloheximid-Derivat der allgemeinen Formel (1):



in der

n eine ganze Zahl von 1 bis 20 bedeutet,

jedes R^{12} unabhängig ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest bedeutet,

R^1 aus einem Sauerstoffatom, einem Schwefelatom oder den Gruppen NR^2 , NOR^2 und $N-NR^2R^3$ ausgewählt wird, wobei

R^2 und R^3 unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, CH_3 , einen Alkylrest, einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit R^6 oder R^{10} substituierten Cycloalkyl- oder Arylrest, einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit R^6 oder R^{10} substituierten Heterocycloalkyl- oder Heteroarylrest, bei denen ein oder mehrere Kohlenstoffatome im Ring durch O, S oder NR^5 ersetzt sind oder einen Rest $-A-X-B$ darstellen, oder

R^2 und R^3 zusammen einen Alkylrest darstellen, der mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 3- bis 5-gliedrigen Ring bilden, der gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten R^6 aufweist, wobei gegebenenfalls ein oder mehrere Kohlenstoffe des Alkylrestes durch $-O-$, $-S-$, $-NR^5-$, Cycloalkylen, Heterocycloalkylen, Arylen oder Heteroarylen ersetzt sind, wobei

R^5 ein Wasserstoffatom, einen Alkylrest oder einen Arylrest darstellt,

R^6 für Alkyl, Aryl, OR^5 , $C(O)OR^5$, CN oder ein Halogenatom steht und R^5 wie vorstehend definiert ist, A einen Alkylrest und B einen Alkylrest darstellt,

X für $-O-$, $-S-$, $-NR^5-$, Cycloalkylen, Heterocycloalkylen, Arylen, Heteroarylen oder eine Einfachbindung steht und R^5 wie vorstehend definiert ist,

R^7 einen Rest $-OH$, $-OR^9$, $-OC(O)R^9$, $-OC(S)R^9$, $-OC(O)NHR^9$, $-OC(S)NHR^9$ oder $-O(CHR^{12})_nR^{10}$ darstellt, wobei

R^9 einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit R^8 substituiertes Aryl- oder Heteroarylrest, bei dem ein oder mehrere Kohlenstoffatome im Ring durch O, S oder NR⁵ ersetzt sind, oder einen Rest $-A-X-B$ darstellt, wobei A, B, X, R^5 und R^6 wie vorstehend definiert sind, und

R^{10} einen Rest $-NHR^2$, $-NR^2R^3$, $-C(O)OR^2$, $-C(S)OR^2$, $-C(O)NR^2R^3$, $-CN$, $-NR^2C(O)NR^2R^3$, $-OC(O)NR^2R^3$, $-NR^2C(S)NR^2R^3$, $-OC(S)NR^2R^3$ oder $-C(O)NHR^{11}$ darstellt, wobei R^2 und R^3 wie vorstehend definiert sind und

R^{11} für einen Aminosäurerest oder Oligopeptidrest steht, oder ein pharmazeutisch verträgliches Salz davon.

Die vorliegende Erfindung beruht auf dem überraschenden Befund, daß der Wirkstoff Cycloheximid (CHX) und von diesem Wirkstoff abgeleitete Derivate die Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase Aktivität von Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerasen (PPIasen) vom FK506-bindenden Typ (FKBPs) hemmen können und auf dem überraschenden Befund, daß diese Derivate im Vergleich zu Cycloheximid nur geringe Toxizität gegenüber eukaryotischen Zelllinien aufweisen. Diese Verbindungen können daher als Therapeutika zur Regeneration von Nervengewebe bei Säugetieren, insbesondere beim Menschen genutzt werden.

Der Begriff "Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerasen" (PPIasen, EC 5.2.1.8) bezieht sich auf eine Gruppe von Enzymen, welche die Interkonversion von *cis* und *trans* Isomeren von Peptidylprolylbindungen katalysieren können. Entdeckt wurden diese Enzyme ursprünglich als Katalysatoren dieser Interkonversion in Oligopeptidsubstraten¹⁾. Die Einteilung dieser Enzyme erfolgt vorwiegend mittels Aminosäure-Sequenzvergleichen aber auch entsprechend ihrer Inhibierbarkeit mit niedermolekularen Inhibitoren²⁾. So werden die als Cyclophiline bezeichneten PPIasen durch den Wirkstoff Cyclosporin A (CsA) und die unter dem Begriff FKBPs zusammengefaßten PPIasen durch den Wirkstoff FK506 inhibiert.

Beide Wirkstoffe zeigen immunsuppressive Eigenschaften³⁾. Verschiedene Untersuchungen belegen, daß die immunsuppressiven Eigenschaften dieser Wirkstoffe über die Bildung ternärer Komplexe zwischen PPlase, ihrem Inhibitor und weiteren Partnern erreicht wird. So können sowohl der Enzym-Inhibitor-Komplex FKBP12-FK506, als auch der Komplex Cyclophilin-CsA an Calcineurin, eine Proteinphosphatase binden und so die Signalkaskade, die zur T-Zell-vermittelten Proliferation führen kann, inhibieren. In ähnlicher Weise kann der Komplex aus FKBP12 und dem PPlase-Inhibitor Rapamycin mit dem RAFT1/FRAP Protein wechselwirken und so die Signalkaskade des IL-2 Rezeptors inhibieren.

Neben diesen immunsuppressiven Eigenschaften sind auch Wirkungen für PPlase-Inhibitoren bekannt, die zur Regeneration beeinträchtigter Nervenzellen führen können⁴⁾. Daneben wurde der Effekt der Unterdrückung der durch FKBP12 vermittelten Hemmung der Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors durch FKBP12-Inhibitoren wie Rapamycin und FK506 beschrieben⁵⁾. FKBP12 bzw. FKBP12.6 modulieren den Kalzium-Ausstrom durch multiple intrazelluläre Kalzium-Kanäle, wie den tetrameren Ryanodin-Rezeptoren der Skelettmuskel- bzw. Herzmuskelzellen. Abdissoziation des rezeptorgebundenen FKBP's durch FKBP12-Inhibitoren, z.B. die Wirkstoffe FK506 und Rapamycin, führt zur Destabilisierung der Kalzium-Kanäle²⁾.

Die Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase Aktivität kann (a) sehr einfach mittels isomerspezifischer Proteolyse mittels für den Assay geeigneter isomerspezifischer Proteasen und geeigneter, eine Peptidylprolyl – Bindung enthaltener Substrate nachgewiesen werden⁶⁾, wie dies im Ausführungsbeispiel (2) beschrieben wird.

Der Nachweis dieser Aktivität kann aber auch mittels anderer Verfahren, wie z.B. (b) mittels isomerspezifischer, spektroskopischer Unterschiede⁷⁾ oder (c) anhand der Katalyse der Renaturierung geeigneter Proteine⁸⁾, oder (d) durch Beobachten der unterschiedlichen isomerspezifischen Mobilität⁹⁾, aber z.B. auch anhand der (e) isomerspezifischen chemischen Verschiebung bei Anwendung der magnetischen Kernresonanzspektroskopie (NMR)¹⁰⁾, geführt werden.

Wenn der Zusatz von Wirkstoffen zu einem der oben aufgeführten Tests zu einer Verminderung der durch PPlase katalysierten Reaktionsgeschwindigkeit führt, werden diese Wirkstoffe als PPlase-Inhibitoren bezeichnet, wie dies im Ausführungsbeispiel (2) exemplarisch gezeigt wird. Durch Variation der für den jeweiligen Assay eingesetzten PPlase kann die PPlase-Spezifität des Inhibitors beurteilt werden. Die Inhibitorkonzentration, welche die PPlase-vermittelte Katalyse um 50% inhibiert, wird als IC_{50} -Wert bezeichnet. Inhibierungskonstanten (K_i -Werte) werden mittels üblicher Methoden¹¹⁾ ermittelt.

Zu den Wirkstoffen, welche diese PPlase-Aktivität in mindestens einer der oben aufgeführten Nachweismethoden vermindern können, gehören die Wirkstoffe Cyclosporin A, FK506 und Rapamycin¹²⁾. Dabei inhibieren die Wirkstoffe FK506 und Rapamycin PPlasen, die zu den FKBP's gezählt werden. Während die Familie der FKBP's durch das Vermögen charakterisiert wird, FK506 bzw. Rapamycin spezifisch zu binden, gibt es auch Vertreter von FKBP's, die entsprechend ihrer Aminosäuresequenzhomologie zu den FKBP's gezählt werden, aber nur eine geringe Affinität zu diesen Wirkstoffen aufweisen. Bisher war unbekannt, das Cycloheximid oder eines seiner Derivate, deren Darstellung exemplarisch in Ausführungsbeispiel (1) beschrieben wird, PPlasen vom FKBP-Typ inhibieren können.

Cycloheximid (4-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxy-ethyl]-2,6-piperidindion; Molekulargewicht: 281,34; Schmelzpunkt: 119–121°) wurde 1947 als Begleiter des Streptomycins aus *Streptomyces griseus* isoliert. Es wirkt in starker Verdünnung gegen viele Hefen, pilzbedingte Hautkrankheiten u. parasitäre Pilze, wie z.B. Erreger der Braunfleckigkeit von Pfirsichen, Blattflecken von Kirschen usw., weniger gegen Bakterien¹³⁾. Nach Jackson¹⁴⁾ und anderen hemmt Cycloheximid die Protein-Biosynthese und wirkt auf Eukaryoten toxisch¹⁵⁾. Cycloheximid findet Verwendung als Fungizid im Obstbau. Es konnte aber auch gezeigt werden, daß nicht-toxische Dosen von CHX andere zusätzliche Effekte verursachen können:

So beschreiben z.B. Akagawa et al¹⁶⁾ mittels kinetischer Analysen daß die Suppression der Induktion bestimmter als „Hitze/Schock“-Gene bezeichneter DNA-

Sequenzen durch CHX sich von den durch die Inhibition der Proteinsynthese hervorgerufenen Effekten bei tierischen Ei-Zellen unterscheiden läßt. Diese differenzierte Wirkung von CHX konnte auch in Tabak-Zellen auf mRNA-Ebene gefunden werden. So beschreiben Imanishi et al¹⁷⁾ die selektive Blockierung bzw. Aktivierung bestimmter mRNAs durch CHX.

Zahlreiche Untersuchungen befassen sich mit CHX-Effekten auf Neuronen. Castagne und Clarke¹⁸⁾ können mittels in vivo Untersuchungen an retinalen Ganglionzellen zeigen, daß CHX den durch Axotomie eingeleiteten Zelltod inhibiert. Kharlamov et al¹⁹⁾, die ein phototrombisches in vivo Modell an Ratten nutzen, demonstrierten ebenfalls, daß CHX Läsionen des Hirns, die üblicherweise in diesem Modell durch Bestrahlung ausgelöst werden, vermindert. Die vor dem Zelltod schützende Eigenschaft des CHX wurde auch an Leberzellen der Ratte gezeigt²⁰⁾. Diese therapeutisch wünschenswerte Wirkung von CHX, die letztendlich sekundär zur Verringerung von Zellschäden führt, die durch andere primäre Faktoren hervorgerufen wurden, kann mittels CHX aufgrund seiner oben beschriebenen hohen Toxizität nur bedingt therapeutisch genutzt werden.

Die Inhibierung der Peptidylprolyl *cis/trans* Isomeraseaktivität von PPlasen durch CHX oder seine Derivate und die Existenz von CHX-Derivaten, die sowohl die PPlase-Aktivität inhibieren können und gleichzeitig, verglichen mit CHX nur geringe toxische Wirkung auf eukaryotische Zelllinien zeigen, wie dies im Ausführungsbeispiel (3) gezeigt wird, die aber auch dadurch gekennzeichnet sind, daß diese erfindungsgemäßen Substanzen bei Anwendung therapeutischer Konzentrationen, therapeutischer geeigneter Formulierungen und therapeutisch geeigneter Applikationsformen regenerative Wirkungen auf Nervenzellgewebe aufweisen, wie dies im Ausführungsbeispiel (4) gezeigt wird, sind bisher nie beschrieben worden.

Aus dem oben gesagten ergibt sich, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen die Regeneration von Nervenzellgewebe stimulieren können und durch ihre verglichen mit CHX geringe Toxizität in der Therapie von Krankheiten eingesetzt werden können, die mit der Schädigung des Nervenzellgewebes in Verbindung stehen.

Vorzugsweise ist die Toxizität der erfindungsgemäßen Verbindung mäßig bis gering und vorzugsweise nicht gegeben gemäß den Kriterien in nachfolgendem Beispiel 3. Vorteilhafterweise liegt der IC_{50} -Wert bei 50-100 $\mu\text{g/ml}$, besonders bevorzugt bei einem IC_{50} -Wert von 100-200 $\mu\text{g/ml}$ und ganz besonders bevorzugt bei einem IC_{50} -Wert von über 200 $\mu\text{g/ml}$.

Die regenerativen Wirkungen der erfindungsgemäßen Verbindungen auf Nervenzellgewebe können nach herkömmlichen Methoden bestimmt werden, beispielsweise wie im Ausführungsbeispiel 4 gezeigt.

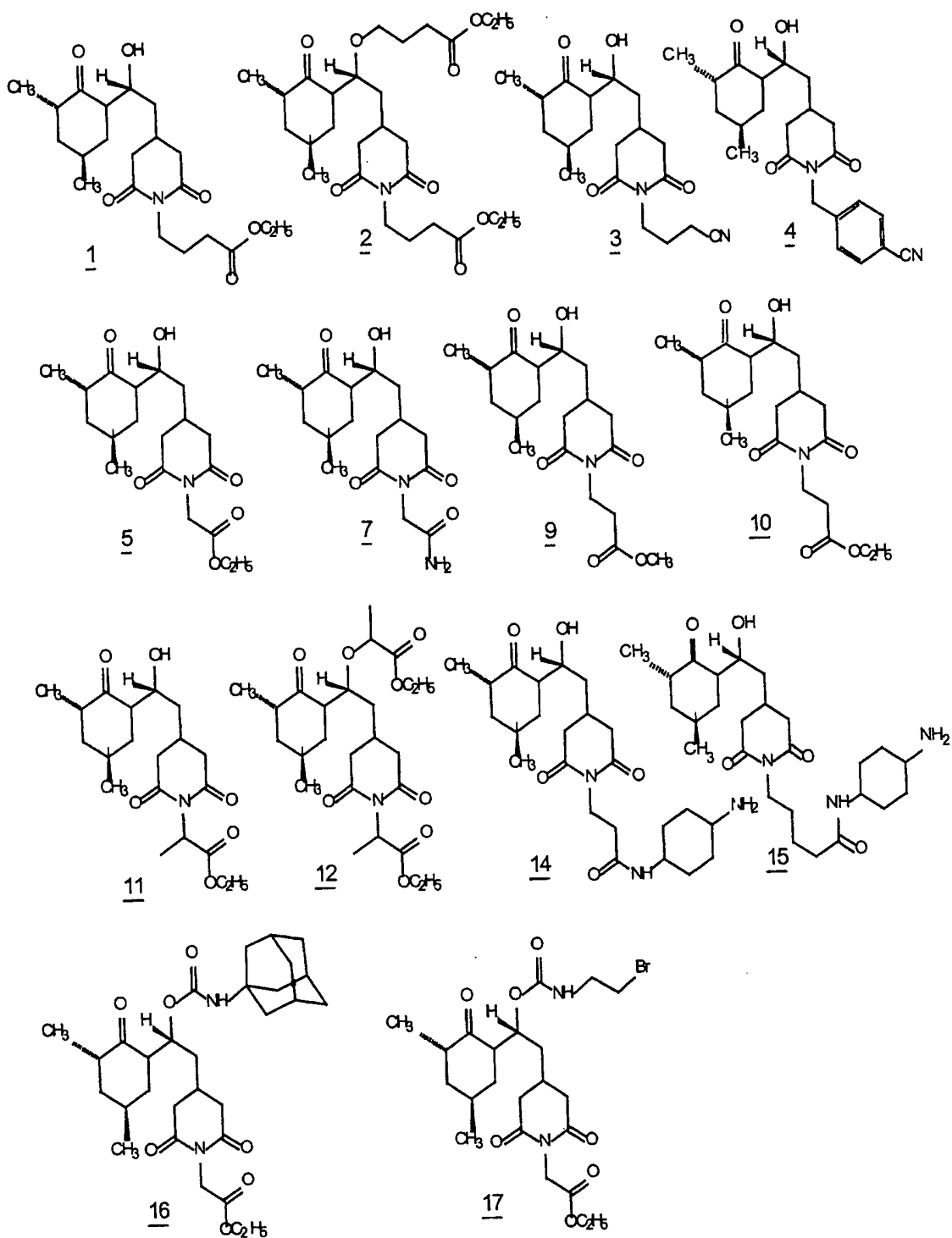
In der vorgenannten Formel (1) ist n vorzugsweise eine ganze Zahl von 1 bis 10. Bevorzugte Definitionen für R^1 sind O, NOH, N-NHPh, N-NHCH₃, N-Alkyl und N-Benzyl. R^7 steht vorzugsweise für OH, $O(\text{CHR}^{12})_n R^{10}$ oder $O(\text{CO})\text{CH}_3$. Bevorzugt steht R^{10} für $\text{C}(\text{O})\text{OCH}_3$, $\text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5$, CN, $\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ und $\text{C}(\text{O})\text{NHR}_{11}$. R^{12} bedeutet vorzugsweise ein Wasserstoffatom, CH₃ oder C₂H₅.

Bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Verbindung der vorgenannten Formel (1) sind Verbindungen für die gilt:

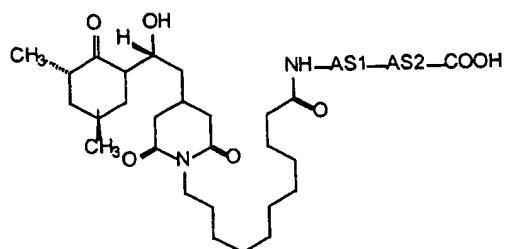
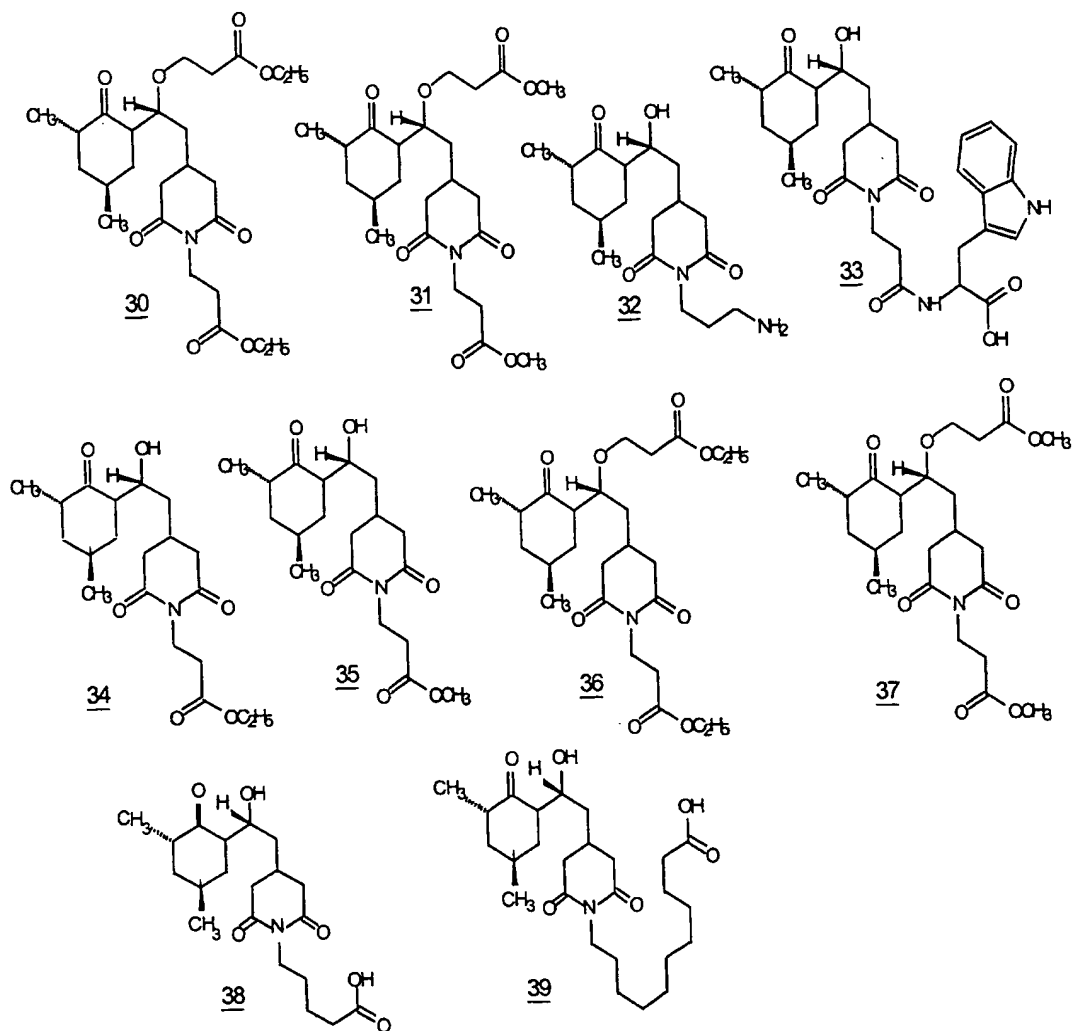
- (a) $n = 1, 2, 3$; $R^1 = \text{O}$; $R^7 = \text{OH}, O(\text{CHR}^{12})_n R^{10}, \text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$; $R^{10} = \text{C}(\text{O})\text{OCH}_3, \text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5, \text{CN}, \text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; $R^{12} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$; oder
- (b) $n = 3-10$; $R^1 = \text{O}$; $R^7 = \text{OH}$; $R^{10} = \text{C}(\text{O})\text{NHR}^{11}$, $R^{11} = \text{Aminosäurerest}, \text{Oligopeptidrest}$; $R^{12} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$; oder
- (c) $n = 1, 2, 3$; $R^1 = \text{O}$; $R^7 = \text{OH}, O(\text{CHR}^{12})_n R^{10}$; $R^{10} = \text{C}(\text{O})\text{OCH}_3, \text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5, \text{CN}, \text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; $R^{12} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$; oder
- (d) $n = 1, 2, 3$; $R^1 = \text{NOH}, \text{N-NHPh}, \text{N-NHCH}_3, \text{N-Alkyl}, \text{N-Benzyl}$; $R^7 = \text{OH}, O(\text{CHR}^{12})_n R^{10}$; $R^{10} = \text{C}(\text{O})\text{OCH}_3, \text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5, \text{CN}, \text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; $R^{12} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$; oder
- (e) $n = 1, 2, 3$; $R^1 = \text{O}$; $R^7 = \text{OH}, O(\text{CHR}^{12})_n R^{10}, \text{OC}(\text{O})\text{NH-Alkyl}, \text{OC}(\text{O})\text{NH-Cycloalkyl}, \text{OC}(\text{O})\text{NH-Aryl}$; $R^{10} = \text{C}(\text{O})\text{OCH}_3, \text{C}(\text{O})\text{OC}_2\text{H}_5, \text{CN}, \text{C}(\text{O})\text{NH}_2$; $R^{12} = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$.

Bevorzugte Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung und die folgenden Verbindungen 1 bis 39 gemäß Formel 1:

10



Verbindung	Aminosäurerest AS1	Aminosäurerest AS2
<u>18</u>	Alanin	Alanin
<u>19</u>	Valin	Alanin
<u>20</u>	Tryptophan	Alanin
<u>21</u>	Isoleucin	Alanin
<u>22</u>	Methionin	Alanin
<u>23</u>	Glycin	Alanin
<u>24</u>	Alanin	Valin
<u>25</u>	Valin	Valin
<u>26</u>	Tryptophan	Valin
<u>27</u>	Isoleucin	Valin
<u>28</u>	Methionin	Valin
<u>29</u>	Glycin	Valin

Verbindung 18-29

In den vorstehenden Formeln der erfindungsgemäßen Verbindungen und im Folgenden bedeuten Alkyl einen geradkettigen oder verzweigten Alkylrest insbesondere C₁-C₈-Alkyl bzw. durch Alkyl, Aryl, Heteroaryl, Halogen, CN, NO₂, S, O, C(O) substituiertes Alkyl. In den vorstehenden Formeln der erfindungsgemäßen Verbindungen und im Folgenden bedeuten Cycloalkyl insbesondere C₄-C₇-Cycloalkyl bzw. bi- und tricyclische Systeme, die durch Alkyl, Aryl, Heteroaryl, Halogen, CN, NO₂, S, O, C(O) substituiert sein können. Aryl bedeutet insbesondere Phenyl bzw. durch Alkyl, Aryl, Heteroaryl, Halogen, CN, NO₂, C(O) substituiertes Aryl und Heteroaryl insbesondere sechsgliedrige Aromaten, die Stickstoff enthalten bzw. fünfgliedrige Aromaten, die Stickstoff, Sauerstoff oder Schwefel enthalten. Oligopeptidreste bedeuten bevorzugt Reste aus 2-5 kondensierten Aminosäuren. Halogen bedeutet F, Cl, Br und I.

In einer bevorzugten Ausführungsform besitzen die erfindungsgemäßen Verbindungen ein Molekulargewicht kleiner als etwa 2000 g/Mol, vorzugsweise kleiner als 1000 g/Mol und insbesondere bevorzugt kleiner als etwa 750 g/Mol. Beispielsweise hat die erfindungsgemäße Verbindung Cycloheximid-N-ethansäureethylester (Substanz 5) ein Molekulargewicht von 367.4.

Wie bereits vorstehend aufgeführt, wird angenommen, ohne daran zu denken, an eine bestimmte Theorie gebunden zu sein, daß die vorteilhaften Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen darauf zurückzuführen sind, daß sie eine Affinität zu FK506-bindende Proteine besitzen und vorzugsweise in der Lage sind, die Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase Aktivität des FK506-bindenden Proteins zu inhibieren. Dementsprechend betrifft die vorliegende Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform die oben beschriebenen Verbindungen, die in der Lage sind die Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase Aktivität des FK506-bindende Proteine zu inhibieren. Wie diese inhibitorische Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen bestimmt werden kann, ist bereits vorstehend ausgeführt worden.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Merkmal ist die vorteilhafte Eigenschaft, daß zumindest der größte Teil der vorgenannten Verbindungen eine geringe Toxizität aufweist; siehe auch das nachfolgende Beispiel 3. In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die vorgenannten Verbindungen im Vergleich zu Cycloheximid eine geringere Toxizität gegenüber eukaryotischen Zelllinien auf. Dabei sind Verbindungen mit den oben beschriebenen bevorzugten IC_{50} -Werten besonders bevorzugt.

Weiterhin zeichnen sich die erfindungsgemäßen Verbindungen vorzugsweise dadurch aus, in der Lage zu sein, bei Anwendung in therapeutischen Mengen, die Regeneration von Nerven therapeutisch zu beeinflussen, d. h. vorzugsweise die Nervenregeneration zu stimulieren oder unterstützend zu begleiten; siehe auch das nachfolgende Ausführungsbeispiel 4.

Im Hinblick auf die vorteilhaften therapeutischen Eigenschaften und die geringe Toxizität der erfindungsgemäßen Verbindungen betrifft die vorliegende Erfindung ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine erfindungsgemäße Verbindung enthalten, gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger.

Beispiele für geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger sind dem Fachmann geläufig und umfassen beispielsweise phosphatgepufferte Salzlösungen, Wasser, Emulsionen, wie z.B. Öl/Wasser-Emulsionen, sterile Lösungen etc.. Zusammensetzungen, die derartige Träger enthalten, können nach gängigen Verfahren formuliert werden. Die Verbindungen der Formel (1) werden in herkömmlichen Dosierungsformen hergestellt, indem eine Verbindung der Formel (1) mit pharmazeutischen Standard-Trägern gemäß herkömmlichen Verfahren kombiniert wird. Die Verbindungen der Formel (1) können auch in herkömmlichen Dosierungen in Kombination mit einer bekannten, zweiten therapeutisch wirksamen Verbindung verabreicht werden. Diese Verfahren können – je nach gewünschtem Mittel – auch das Mischen, Granulieren und Pressen oder Lösen der Inhaltsstoffe beinhalten.

Der eingesetzte pharmazeutische Träger kann z.B. entweder ein Feststoff oder eine Flüssigkeit sein. Beispiele für feste Träger sind Lactose, Terra alba, Saccharose, Talk, Gelatine, Agar, Pektin, Gummiarabicum, Magnesiumstearat, Stearinsäure und dergleichen. Beispiele für flüssige Träger sind Sirup, Erdnußöl, Olivenöl, Wasser und dergleichen. Entsprechend kann der Träger oder das Verdünnungsmittel im Fachgebiet bekannte Zeitverzögerungsmaterialien enthalten, wie Glycerylmonostearat oder Glyceryldistearat allein oder mit einem Wachs. Mann kann eine große Vielzahl pharmazeutischer Formen einsetzen. Wenn somit ein fester Träger verwendet wird, dann kann das Mittel tablettiert werden, in eine Hartgelatine kapsel in Pulver- oder Pelletform gefüllt oder in Form einer Pastille ("Troche" bzw. "Lozeng") gebracht werden. Die Menge des festen Trägers variiert stark, reicht jedoch vorzugsweise von etwa 25 mg bis etwa 1 g. Wenn ein flüssiger Träger verwendet wird, hat das Mittel die Form eines Sirups, einer Emulsion, einer Weichgelatine kapsel, einer sterilen injizierbaren Flüssigkeit, wie eine Ampulle oder eine nichtwäßrige flüssige Suspension.

Die Menge einer Verbindung der Formel (1), die für eine therapeutische Wirkung bei topischer Verabreichung erforderlich ist, variiert bei allen hier offenbarten Gebrauchsverfahren in Abhängigkeit von der ausgewählten Verbindung und der Art und Stärke der Nervenzellschädigungen, und vom behandelten Patienten und liegt schließlich im Ermessen des Arztes. Eine geeignete topische entzündungshemmende Dosis eines Wirkstoffes, d.h. einer Verbindung der Formel (1), beträgt 0,1 mg bis 150 mg und wird ein- bis viermal, bevorzugt zwei- bis dreimal täglich verabreicht.

Topische Verabreichung bedeutet nicht-systemische Verabreichung und beinhaltet die Anwendung einer Verbindung der Formel (1) extern auf die Epidermis, in die Mundhöhle und das Eintropfen dieser Verbindung in Ohr, Auge und Nase, und an Stellen, bei denen die Verbindung nicht signifikant in den Blutstrom eintritt. Systemische Verabreichung bedeutet oral, intravenöse, intraperitoneale und intramuskuläre Verabreichung.

Es ist zwar möglich, den Wirkstoff allein als Rohchemikalie zu verabreichen, bevorzugt wird er jedoch als pharmazeutische Formulierung dargereicht. Der Wirkstoff kann für die topische Verabreichung 0,001% bis 10% (Gew./Gew.), z.B. 1 bis 2 Gew.% der Formulierung, umfassen, obwohl er bis zu 10% (Gew./Gew.), jedoch vorzugsweise nicht mehr als 5% (Gew./Gew.) und stärker bevorzugt von 0,1% bis 1% (Gew./Gew.) der Formulierung umfassen kann.

Die erfindungsgemäßen topischen Verbindungen umfassen einen Wirkstoff, zusammen mit einem oder mehreren verträglichen Träger(n) dafür und wahlweise (einen) andere(n) therapeutische(n) Inhaltsstoff(e). Der/die Träger muß/müssen in dem Sinne "verträglich" sein, daß er/sie mit den anderen Inhaltsstoffen der Formulierung kompatibel ist/sind und für den Empfänger daher nicht schädlich ist/sind.

Die zur topischen Verabreichung geeigneten Formulierungen sind u.a. flüssige oder halbflüssige Mittel, die die Haut bis zum Wirkort durchdringen können, wie Einreibemittel, Lotionen, Cremes, Salben oder Pasten und Tropfen, die sich zur Verabreichung an Auge, Ohr oder Nase eignen.

Die erfindungsgemäßen Tropfen können sterile wässrige oder ölige Lösungen oder Suspensionen umfassen, und können durch Lösen des Wirkstoffs in einer geeigneten wäßrigen Lösung eines bakteriziden und/oder fungiziden Mittels und/oder eines anderen geeigneten Konservierungsmittels hergestellt werden, und enthalten vorzugsweise auch ein grenzflächenaktives Mittel. Die entstandene Lösung kann dann durch Filtration geklärt werden, in einen geeigneten Behälter überführt werden, der dann verschlossen und durch Autoklavieren oder Halten bei 98-100°C für eine halbe Stunde sterilisiert wird. Die Lösung kann alternativ durch Filtration sterilisiert und über ein keimfreies Verfahren in den Behälter überführt werden. Beispiele für bakterizide und fungizide Mittel, die geeigneterweise in die Tropfen aufgenommen werden können, sind Phenylquecksilbernitrat oder -acetat (0,002%), Benzalkoniumchlorid (0,01%) und Chlorhexidinacetat (0,01%). Geeig-

nete Lösungsmittel für die Herstellung einer öligen Lösung sind u.a. Glycerin, verdünnter Alkohol und Propylenglycol.

Erfindungsgemäße Lotionen beinhalten solche, die sich zum Aufbringen auf die Haut oder ins Auge eignen. Eine Augenlösung kann eine sterile wäßrige Lösung umfassen, die gegebenenfalls ein Bakterizid enthält, und durch Verfahren hergestellt werden kann, die denen zur Herstellung von Tropfen ähneln. Lotionen und Einreibemittel zum Aufbringen auf die Haut können auch ein Mittel enthalten, das das Trocknen beschleunigt und die Haut kühlt, wie Alkohol oder Aceton, und/oder ein Feuchthaltemittel, wie Glycerin oder ein Öl, wie Rhizinusöl oder Erdnußöl.

Erfindungsgemäße Cremes, Salben oder Pasten sind halbfeste Formulierungen des Wirkstoffes für die äußere Anwendung. Sie können hergestellt werden, indem der Wirkstoff in feinteiliger oder pulverisierter Form, allein oder in Lösung oder Suspension in einer wäßrigen oder nicht-wäßrigen Flüssigkeit, mittels geeigneter Maschinerie, mit einer fettigen oder nichtfettigen Basis gemischt wird. Die Basis kann Kohlenwasserstoffe umfassen, wie Hart-, Weich- oder Flüssigparaffin, Glycerin, Bienenwachs, eine Metallseife; einen Schleimstoff, ein Öl natürlichen Ursprungs, wie Mandel-, Mais-, Erdnuß-, Rhizinus- oder Olivenöl, Wollfett oder dessen Derivate, oder eine Fettsäure, wie Stearinsäure oder Oleinsäure, zusammen mit einem Alkohol, wie Propylenglykol oder Makrogelen. Die Formulierung kann ein geeignetes grenzflächenaktive Mittel beinhalten, wie ein anionisches, kationisches oder nicht-ionisches grenzflächenaktives Mittel, wie Sorbitanester oder Polyoxyethylenderivate davon. Suspendierungsmittel, wie Naturkautschuke, Cellulosederivate oder anorganische Materialien wie kieselensäurehaltige Siliziumdioxide und andere Inhaltsstoffe, wie Lanolin, können ebenfalls enthalten sein.

Die erfindungsgemäßen Verfahren können durchgeführt werden, indem der erfindungsgemäße Wirkstoff beispielsweise parenteral verabreicht wird. Der hier verwendete Begriff "parenteral" steht für intravenöse, intramuskuläre, subkutane, intranasale, intrarektale, intravaginale oder intraperitoneale Verabreichung. Die sub-

kutanen und intramuskulären Formen der parenteralen Verabreichung werden gewöhnlich bevorzugt. Die geeigneten Dosierungsformen für diese Verabreichung können durch herkömmliche Techniken hergestellt werden.

Bei allen hier offenbarten Gebrauchsverfahren für die Verbindungen der Formeln (1) reicht das tägliche orale Dosierungsschema vorzugsweise von etwa 0,05 bis etwa 80 mg/kg Gesamtkörpergewicht, vorzugsweise von etwa 0,1 bis 30 mg/kg, stärker bevorzugt von etwa 0,5 bis 15 mg/kg. Das tägliche parenterale Dosierungsschema reicht vorzugsweise von etwa 0,05 bis etwa 80 mg pro Kilogramm (kg) Gesamtkörpergewicht, vorzugsweise von etwa 0,1 bis etwa 30 mg/kg, und stärker bevorzugt von etwa 0,5 bis 15 mg/kg.

Die Verbindungen der Formel (1) können auch durch Inhalierung verabreicht werden. "Inhalierung" bedeutet intranasale und orale Inhalierungsverabreichung. Geeignete Dosierungsformen für diese Verabreichung, wie Aerosolformulierung oder ein Meßdosis-Inhalator, können durch herkömmliche Techniken hergestellt werden. Die bevorzugte tägliche Dosierungsmenge einer Verbindung der Formel (1), die für alle hier offenbarten Verfahren durch Inhalierung verabreicht wird, reicht von etwa 0,01 mg/kg bis etwa 1 mg/kg pro Tag.

Der Fachmann weiß, daß die Form und die Eigenschaft des pharmazeutisch verträglichen Trägers oder Verdünnungsmittels von der zu kombinierenden Wirkstoffmenge, dem Verabreichungsweg und anderen wohlbekannten Variablen bestimmt wird.

Der Fachmann weiß auch, daß die optimale Menge und der optimale Abstand von Einzeldosierungen einer Verbindung der Formel (1) oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon von der Art und dem Ausmaß des zu behandelnden Leidens, der Verabreichungsform, dem Verabreichungsweg und der Verabreichungsstelle und dem jeweils behandelten Patienten bestimmt wird, und daß diese Optimalwerte durch herkömmliche Techniken bestimmt werden können.

Der Fachmann ist sich auch darüber bewußt, daß der optimale Behandlungsverlauf, d.h. die Anzahl der Dosen einer Verbindung der Formel (1) oder eines pharmazeutisch verträglichen Salzes davon, die täglich für eine bestimmte Anzahl von Tagen gegeben werden, vom Fachmann über herkömmliche Behandlungsverlaufs-Bestimmungstest bestimmt werden kann.

Die Dosierung hängt dabei von vielen Faktoren ab, z.B. dem Geschlecht, dem Gewicht, dem Alter des Patienten, sowie der Art der speziell verabreichten Verbindung, der Art der Verabreichung etc.. Im allgemeinen liegt die täglich verabreichte Dosis bei 1 µg bis 10mg Einheiten pro Tag. Im Zusammenhang mit der intravenösen Injektion von der Verbindung der Substanzklasse der erfindungsgemäßen Verbindungen sind Dosierungen von etwa 1-40 mg/kg Körpergewicht pro Tag gängig. Die Zusammensetzungen können lokal oder systemisch verabreicht werden. Im allgemeinen wird die Verabreichung parenteral erfolgen, z.B. intravenös. Nach chirurgischen Eingriffen kann eine lokale Verabreichung z.B. über ein Pflaster mit Depotwirkung bevorzugt sein. Nach chirurgischen Eingriffen kann es aber auch von Vorteil sein, die lokale Verabreichung unmittelbar in die Nähe des zum Wachstum zu beeinflussenden Nervengewebes zu verbringen, z.B. mittels einer Drainage oder eines örtlichen Trägermaterials. Das Trägermaterial weist dabei die Beschaffenheit auf, daß es geeignet ist, den zu verabreichenden Wirkstoff unmittelbar in einer therapeutisch gewünschten Zeit- und Dosis-abhängigen Weise an den Wirkort zu verbringen. Eine weitere Eigenschaft kann sein, daß das Trägermaterial durch körpereigene Prozesse abbaubar ist, so daß kein weiterer chirurgischer Eingriff zur Entfernung des Trägermaterials notwendig ist. Es kann aber auch von Vorteil sein, solches Trägermaterial einzusetzen, welches nach der erwünschten Wirkung einer Nervenregeneration durch geeignete chirurgische Maßnahmen wieder entfernt wird.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Verbindung oder einer Verbindung, die die vorgenannten Eigenschaften der

erfindungsgemäßen Verbindungen aufweist, beispielsweise die Eigenschaft, die Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase Aktivität des FK506 bindenden Proteins zu inhibieren, eine geringe Toxizität aufzuweisen und therapeutische Effekt insbesondere auf die Regeneration von Nerven zu entfalten zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Nervenzellkrankheiten. Neben der chemischen Derivatisierung der oben beschriebenen Verbindungen können solche Verbindungen auch durch Überlegungen zu deren Struktur aufgefunden werden. Beispielsweise können dreidimensionale und/oder kristallografische Strukturanalysen der erfindungsgemäßen Verbindungen insbesondere derjenigen, die besonders geringe Toxizität und eine hohe Wirkung auf die Regeneration von Nervengewebe zeigen, zum Design von erfindungsgemäßen Wirkstoffen dienen. Solche Ansätze sind bereits mit anderen Systemen erprobt, siehe beispielsweise Rose, Biochemistry 35 (1996), 12933-12944; Rutenber, Bioorg. Med. Chem. 4 (1996), 1545-1558. Weiterhin können xenobiotische Wirkstoffe identifiziert werden, die nicht oder nicht unmittelbar von Cycloheximid abgeleitet werden können. Die biologischen Eigenschaften solcher Verbindungen können beispielsweise gemäß den nachfolgenden Ausführungsbeispielen getestet werden.

Es sind ferner eingeschlossen alle Verbindungen, die in einer Pro-Form verabreicht werden können und im Körper in eine der wirksamen und wie oben definierten Strukturen metabolisiert werden können. Die erfindungsgemäßen Verbindungen oder an diesen orientierte Derivate können von dem Fachmann bekannterweise hergestellt werden (siehe z.B. Piatak D.M. et. al. (1986), J. Med. Chem. 29, 50-54).

Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden zum Beispiel hergestellt, indem in bekannter Weise

- (a) Cycloheximid und geeignete Derivate in einem geeigneten Lösungsmittel, wie zum Beispiel wasserfreien Dimethylformamid, bei Raumtemperatur mit Halogenalkylverbindungen und einer geeigneten Base, wie K_2CO_3 zu den entsprechenden N-Alkyl- bzw. N,O-Bisalkylverbindungen umgesetzt werden.

- (b) Cycloheximid und geeignete Derivate in einem geeigneten Lösungsmittel, wie zum Beispiel wasserfreien Aceton, bei Raumtemperatur mit Halogenalkylverbindungen und einer geeigneten Base, wie K_2CO_3 unter Zusatz katalytischer Mengen an Kronenethern, wie z.B. 18-Krone-6-ether zu den entsprechenden N-Alkyl- bzw. N,O-Bisalkylverbindungen umgesetzt werden.
- (c) Cycloheximid und geeignete Derivate in einem geeigneten Lösungsmittel, wie zum Beispiel wasserfreien Aceton, bei Siedehitze mit Halogenalkylverbindungen und einer geeigneten Base, wie K_2CO_3 unter Zusatz katalytischer Mengen an Kronenethern, wie z.B. 18-Krone-6-ether zu den entsprechenden N-Alkyl- bzw. N,O-Bisalkylverbindungen umgesetzt werden.
- (d) Cycloheximid und geeignete Derivate in einem geeigneten Lösungsmittel, wie zum Beispiel wasserfreien Dimethylformamid, bei Raumtemperatur mit an Trägermaterialien (übliche Harze für Festphasenreaktionen) gebundenen Halogenalkylverbindungen und einer geeigneten Base, wie K_2CO_3 unter Zusatz katalytischer Mengen an Kronenethern, wie z.B. 18-Krone-6-ether zu den entsprechenden N-Alkylverbindungen umgesetzt und in gewohnter Weise vom Träger abgespalten werden.
- (e) Cycloheximid-Derivate in einem geeigneten Lösungsmittel, wie zum Beispiel Pyridin, bei Raumtemperatur mit Carbonsäureanhydriden zu den entsprechenden Estern umgesetzt werden.
- (f) Cycloheximid-Derivate in einem geeigneten Lösungsmittel, wie zum Beispiel einem Gemisch aus Pyridin/ H_2O (2:1), bei Raumtemperatur mit Hydroxylamin-Hydrochloriden zu den entsprechenden Oximen umgesetzt werden.
- (g) Cycloheximid-Derivate in einem geeigneten Lösungsmittel, wie zum Beispiel wasserfreien Methanol, bei Raumtemperatur mit Hydrazinen zu den entsprechenden Hydrazonen umgesetzt werden.
- (h) Cycloheximid-Derivate in einem geeigneten Lösungsmittel, wie zum Beispiel wasserfreien Methanol, bei Raumtemperatur mit primären Aminen zu den entsprechenden Azomethinen umgesetzt werden.
- (i) Cycloheximid-Derivate in einem geeigneten Lösungsmittel, wie zum Beispiel Methylenchlorid, bei Raumtemperatur mit Isocyanaten und einem geeig-

ten Katalysator, wie zum Beispiel HCl, zu den entsprechenden Urethanen umgesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch zusammen mit bekannten, nervenregenerationsfördernden Wirkstoffen verabreicht werden.

Die erfindungsgemäßen Cycloheximid-Derivate können z.B. verabreicht werden (a) bei zu erwartenden Schlaganfällen oder sonstigen Nervenzellschädigungen als vorbeugende Gabe zur Vermeidung oder Begrenzung dieser Nervenzellschädigungen, (b) zur Förderung des Nervenwachstums von infolge chirurgischer Eingriffe bzw. unfallbedingt unterbrochener Nervenbahnen und (c) zur Behandlung allgemeiner Nervenzellschädigungen, die durch Regeneration gelindert oder geheilt werden können.

Die Abbildungen zeigen:

Abbildung 1:

Inhibierung von hrFKBP12 durch Substanz 5: Puffer: 35 mM HEPES (pH 7.8); Substrat: 69.8 μ M Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-(4-) NA; Protease: 1.7 mg/ml α -Chymotrypsin; 16 nM rhFKPB12, Effektor: Substanz 3, Stammlösung 10 mg/ml in Ethanol, Konzentration im Meßansatz 250-0.1 μ M; Temp.: 10°C.

Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung. Der Fachmann kann ohne weitere Ausarbeitung anhand der vorstehenden Beschreibung die vorliegende Erfindung im vollsten Ausmaß nutzen. Die nachstehenden Beispiele werden daher nur als Veranschaulichung und keineswegs als Einschränkung des Umfangs der vorliegenden Erfindung gegeben.

BEISPIEL 1: In vitro Synthese von Derivaten des Cycloheximids

Alle Substanzen wurden mittels konventioneller, dem Fachmann allgemein bekannter, chemischer Verfahren unter Verwendung kommerziell verfügbaren Cycloheximids so hergestellt, wie es für die Substanzen 1 – 29 beispielhaft angegeben wird:

Substanz 1: Cycloheximid-N-4-butansäureethylester

500 mg (1.78 mmol) Cycloheximid werden in 10 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 414 mg (3.0 mmol) K_2CO_3 und 390 mg (2.0 mmol) 4-Brombuttersäureethylester gegeben. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 72 h wird die Reaktionsmischung im Vakuum eingeeengt und das feste Produkt in 10 ml $CHCl_3$ /Essigester (2:1) aufgenommen. Unlösliche Bestandteile werden abfiltriert und die Lösung säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als stationäre Phase wird SiO_2 (230-400 mesh) verwendet. Als Laufmittel dient $CHCl_3$ / Essigsäureethylester (EE) (2:1). Die zweite Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 197 mg (27.8 %), farbloses, zähflüssiges Öl.

Analyse: ($C_{21}H_{35}NO_6$, $M = 397.52$ g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 397.8$ m/e;

Ber.: C 63.45, H 8.87, N 3.52, Gef.: C 63.60, H 8.84, N 3.34%.

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 0.85-1.10 (d + t, 6 H, $J(d) = 6.4$ Hz); 1.24 (d, 3 H, $J = 7.2$ Hz); 1.8-3.4 (m, 21 H); 3.68 (m, 1 H); 3.91 (t, 2 H, $J = 6.6$ Hz); 4.05 (m, 1 H).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ 14.1 (s, \underline{CH}_3CHCO); 15.1 (s, \underline{CH}_3CH_2); 18.3 (s, $\underline{CH}_3CH(CH_2)_2$); 170.9 (s, COO); 172.3 (s, CO-NH); 172.3 (s, CO-NH); 216.5 (s, $CH-\underline{CO}-CH$).

Substanz 2: *Cycloheximid-N,O-bis-4-butansäureethylester*

Die Aufarbeitung der 1. Fraktion ergibt Cycloheximid-N,O-bis-4-butansäureethylester.

Ausbeute: 83 mg (9.1 %), farbloses, zähflüssiges Öl.

Analyse: (C₂₇H₄₃NO₈, M = 509.65 g/mol); MALDI-TOF-MS: [M+H]⁺ = 509.8 m/e;

Ber.: C 63.63, H 8.50, N 2.75, Gef.: C 63.42, H 8.74, N 2.94%.

Substanz 3: *Cycloheximid-N-4-butansäurenitril*

250 mg (0.89 mmol) Cycloheximid werden in 5 ml Aceton gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 210 mg (1.52 mmol) K₂CO₃, 20 mg (0.08 mmol) 18-Crown-6 und 0.20 mg (1.35 mmol) 4-Brombuttersäurenitril gegeben. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 72 h werden unlösliche Bestandteile abfiltriert und die Reaktionsmischung wird im Vakuum eingeeengt. Das ölige Produkt wird in 10 ml CHCl₃/Essigester (1:1) aufgenommen und die Lösung säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als stationäre Phase wird SiO₂ (230-400 mesh) verwendet. Als Laufmittel dient CHCl₃ / Essigester (1:1). Die zweite Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 125 mg (40.3 %), farbloses, zähflüssiges Öl.

Analyse: (C₁₉H₂₈N₂O₄, M = 348.44 g/mol); MALDI-TOF-MS: [M+H]⁺ = 349.6 m/e;

Ber.: C 65.49, H 8.10, N 8.04, Gef.: C 65.20, H 8.04, N 8.18%.

Substanz 4: *Cycloheximid-N-methyl-p-benzoesäurenitril*

300 mg (1.07 mmol) Cycloheximid werden in 3 ml Aceton gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 250 mg (1.81 mmol) K₂CO₃, 20 mg (0.08 mmol) 18-Crown-6 und 250 mg (1.27 mmol) 4-Brommethylbenzoesäurenitril gegeben. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 72 h werden unlösliche Bestandteile abfiltriert und die Reaktionsmischung wird im Vakuum eingeeengt. Das ölige Produkt wird in 10 ml CHCl₃/Essigester (1:1) aufgenommen und die Lösung säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als stationäre Phase wird SiO₂ (230-400 mesh)

verwendet. Als Laufmittel dient CHCl_3 / Essigester (1:1). Die zweite Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 135 mg (40.3 %), farbloses, zähflüssiges Öl.

Analyse: ($\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$, $M = 396.48 \text{ g/mol}$); MALDI-TOF-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 398.1 \text{ m/e}$;

Ber.: C 65.49, H 8.10, N 8.04, Gef.: C 65.20, H 8.04, N 8.18%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 0.98 (d, 3 H, $J = 6.4 \text{ Hz}$); 1.24 (d, 3 H, $J = 7.1 \text{ Hz}$); 1.50- 3.60 (m, 14 H); 4.19 (m, 1 H); 4.94 (s, 2 H); 7.51-7.67 (m, 4 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14.0 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CHCO}}$); 21.1 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_2)_2}$); 118.6 (s, CN); 129.2, 131.2, 132.4, 133.5 (s, C_6H_4); 171.9 (s, CO-NH); 172.1 (s, CO-NH); 216.5 (s, CH-CO-CH).

Substanz 5: *Cycloheximid-N-ethansäureethylester*

5.0 g (17.8 mmol) Cycloheximid werden in 35 ml Aceton gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 3.0 g (21.6 mmol) K_2CO_3 , 100 mg (0.38 mmol) 18-Crown-6 und 3 ml (27.0 mmol) 2-Bromessigsäureethylester gegeben. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 72 h wird die Reaktionsmischung filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das ölige Produkt wird in 20 ml CHCl_3 /Essigester (2:1) aufgenommen. Die Lösung wird säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als stationäre Phase wird SiO_2 (230-400 mesh) verwendet. Als Laufmittel dient CHCl_3 / EE (2:1). Die zweite Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 4.3 g (65.7 %), farblose Kristalle (EE), $\text{Fp} = 100-101^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}} = 8.7^\circ$ (Pyridin).

Analyse: ($\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_6$, $M = 367.45 \text{ g/mol}$); MALDI-TOF-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 368.8 \text{ m/e}$;

Ber.: C 62.11, H 7.96, N 3.81, Gef.: C 61.99, H 7.91, N 3.87%.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 0.99 (d, 3 H, $J = 6.4 \text{ Hz}$); 1.20-1.35 (d+t, 6 H, $J(\text{d}) = 7.2 \text{ Hz}$, $J(\text{t}) = 7.2 \text{ Hz}$); 1.55-2.95 (m, 14 H); 4.10-4.30 (q+m, 3 H, $J(\text{q}) = 7.1 \text{ Hz}$); 4.49 (s, 2 H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): δ 14.0 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CHCO}}$); 14.1 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CH}_2}$); 18.3 (s, $\underline{\text{CH}_3\text{CH}}$); 40.5 (s, $\underline{\text{CH}_2\text{COO}}$); 61.4 (s, CH_2O); 66.5 (s, CHOH); 167.9 (s, COO); 171.6 (s, CO-NH); 171.8 (s, CO-NH); 216.4 (s, CH-CO-CH).

Substanz 7: Cycloheximid-N-ethansäureamid

500 mg (1.78 mmol) Cycloheximid werden in 10 ml Aceton gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 420 mg (3.04 mmol) K_2CO_3 , 20 mg (0.08 mmol) 18-Crown-6 und 270 mg (1.96 mmol) 2-Bromessigsäureamid gegeben. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 72 h wird die Reaktionsmischung filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das ölige Produkt wird in 15 ml $CHCl_3$ /Essigester (2:1) aufgenommen. Die Lösung wird säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als stationäre Phase wird SiO_2 (230-400 mesh) verwendet. Als Laufmittel dient $CHCl_3$ / EE (2:1). Die zweite Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 210 mg (34.8 %), farbloses, amorphes Pulver.

Analyse: ($C_{17}H_{26}N_2O_5$, M = 338.41 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 339.7$ m/e;

Ber.: C 60.34, H 7.74, N 8.28, Gef.: C 60.17, H 7.77, N 8.02%.

1H -NMR ($CDCl_3$): δ 0.97 (d, 3 H, J = 6.4 Hz); 1.23 (d, 3 H, J = 7.1 Hz); 1.55-2.90 (m, 14 H); 4.15 (m, 1 H); 4.43 (s, 2 H); 5.80-6.20 (m, 2 H).

^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ 14.2 (s, \underline{CH}_3CHCO); 18.3 (s, \underline{CH}_3CH); 40.4 (s, \underline{CH}_2COO); 66.5 (s, $CHOH$); 169.6 (s, COO); 172.1 (s, $CO-NH$); 172.3 (s, $CO-NH$); 216.3 (s, $CH-\underline{CO}-CH$).

Substanz 9: Cycloheximid-N-3-propionsäuremethylester

500 mg (1.78 mmol) Cycloheximid werden in 40 ml Aceton gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 2.0 g (14.5 mmol) K_2CO_3 , 100 mg (0.38 mmol) 18-Crown-6 und 2.5 ml (22.9 mmol) 3-Brompropionsäuremethylester gegeben. Anschließend wird unter Rühren 72 h zum Sieden erhitzt. Danach wird die Reaktionsmischung filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wird in 15 ml $CHCl_3$ /Essigester (2:1) aufgenommen. Die Lösung wird säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als stationäre Phase wird SiO_2 (230-400 mesh) verwendet. Als Laufmittel dient $CHCl_3$ / EE (2:1). Die zweite Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 220 mg (33.6 %), farbloses zähflüssiges Öl.

Analyse: ($C_{19}H_{29}NO_6$, $M = 367.45$ g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 368.9$ m/e;
Ber.: C 62.11, H 7.96, N 3.81, Gef.: C 61.89, H 7.93, N 3.73%.

Substanz 10: *Cycloheximid-N-3-propionsäureethylester*

500 mg (1.78 mmol) Cycloheximid werden in 40 ml Aceton gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 2.0 g (14.5 mmol) K_2CO_3 , 100 mg (0.38 mmol) 18-Crown-6 und 2.5 ml (20.0 mmol) 3-Brompropionsäureethylester gegeben. Anschließend wird unter Rühren 72 h zum Sieden erhitzt. Danach wird die Reaktionsmischung filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das Produkt wird in 15 ml $CHCl_3$ /Essigester (2:1) aufgenommen. Die Lösung wird säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als stationäre Phase wird SiO_2 (230-400 mesh) verwendet. Als Laufmittel dient $CHCl_3$ /EE (2:1). Die zweite Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 110 mg (16.2 %), farbloses zähflüssiges Öl.

Analyse: ($C_{20}H_{31}NO_6$, $M = 381.47$ g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 382.8$ m/e;
Ber.: C 62.97, H 8.19, N 3.67, Gef.: C 62.84, H 8.03, N 3.72%.

Substanz 11: *Cycloheximid-N-(+/-)-2-propionsäureethylester*

500 mg (1.78 mmol) Cycloheximid werden in 20 ml Aceton gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 420 mg (3.04 mmol) K_2CO_3 , 20 mg (0.08 mmol) 18-Crown-6 und 1.75 ml (13.5 mmol) (+/-)-2-Brompropionsäureethylester gegeben. Anschließend wird bei Raumtemperatur gerührt. Nach 72 h wird die Reaktionsmischung filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das ölige Produkt wird in 20 ml $CHCl_3$ /Essigester (2:1) aufgenommen. Die Lösung wird säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als stationäre Phase wird SiO_2 (230-400 mesh) verwendet und eluiert wird mit $CHCl_3$ /EE (2:1). Die dritte Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 110 mg (16.2 %), farbloses zähflüssiges Öl.

Analyse: ($C_{20}H_{31}NO_6$, $M = 381.47$ g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 382.9$ m/e;
Ber.: C 62.97, H 8.19, N 3.67, Gef.: C 62.84, H 8.03, N 3.72%.

Substanz 13: *Cycloheximid-N,O-bis-(+/-)-2-propionsäureethylester*

Die Aufarbeitung der 2. Fraktion ergibt Cycloheximid-N,O-bis-4-butansäureethylester.

Ausbeute: 73 mg (9.1 %), farbloses, zähflüssiges Öl.

Analyse: (C₂₅H₃₉NO₈, M = 481.59 g/mol); MALDI-TOF-MS: [M+H]⁺ = 483.0 m/e;

Ber.: C 62.35, H 8.16, N 2.91, Gef.: C 62.22, H 8.14, N 2.81%.

Substanz 14: *Cycloheximid-N-3-propionsäure(4-aminocyclohexyl)amid*CF₃COOH*

100 mg Chlorotrityl-Harz (0.93 mmol/g, Fa. NovaBiochem), 250 mg (2.19 mmol) 1,4-trans-Diaminocyclohexan, 2 ml CH₂Cl₂ und 1 ml Diisopropylethylamin (DIEA) werden 12 h bei RT umgesetzt. Anschließend wird dreimal mit je 2 ml CH₂Cl₂, MeOH, Ether gewaschen. Das Harz wird in 2 ml N-Methylpyrrolidon (NMP) aufgenommen. Dazu werden 80 mg (0.52 mmol) 3-Brompropionsäure, 120 mg (0.78 mmol) Hydroxybenzotriazol (HOBt) und 85 µl (0.55 mmol) Diisopropylcarbodiimid (DIC) gegeben. Nach 12 h schütteln bei RT wird filtriert und wie oben gewaschen. Das Harz wird in 4 ml Aceton und 1 ml CH₂Cl₂ aufgenommen und 48 h bei 35°C mit 100 mg (0.36 mmol) Cycloheximid, 200 mg (1.45 mmol) K₂CO₃ und 20 mg (0.08 mmol) 18-Crown-6 umgesetzt. Anschließend wird zweimal mit je 3 ml Aceton und dann weiter wie oben gewaschen. Die Substanz wird auf gewohnte Weise mit 5%iger Trifluoressigsäure in CH₂Cl₂ vom Harz abgespalten und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 23 mg (43.9 %); weißes Pulver.

Analyse: (C₂₆H₄₀F₃N₃O₇, M = 563.62 g/mol);

MALDI-TOF-MS: [M-CF₃COO]⁺ = 450.8 m/e.

Substanz 15: *Cycloheximid-N-3-valeriansäure(4-aminocyclohexyl)amid*CF₃COOH*

100 mg Chlorotrityl-Harz (0.93 mmol/g, Fa. NovaBiochem), 250 mg (2.19 mmol) 1,4-trans-Diaminocyclohexan, 2 ml CH₂Cl₂ und 1 ml DIEA werden 12 h bei RT umgesetzt. Anschließend wird dreimal mit je 2 ml CH₂Cl₂, MeOH, Ether gewaschen. Das Harz wird in 2 ml NMP aufgenommen. Dazu werden 95 mg (0.52 mmol) 5-

Bromvaleriansäure, 120 mg (0.78 mmol) HOBt und 85 μ l (0.55 mmol) DIC gegeben. Nach 12 h schütteln bei RT wird filtriert und wie oben gewaschen. Das Harz wird in 4 ml Aceton und 1 ml CH_2Cl_2 aufgenommen und 48 h bei 35°C mit 100 mg (0.36 mmol) Cycloheximid, 200 mg (1.45 mmol) K_2CO_3 und 20 mg (0.08 mmol) 18-Crown-6 umgesetzt. Anschließend wird zweimal mit je 3 ml Aceton und dann weiter wie oben gewaschen. Die Substanz wird auf gewohnte Weise mit 5%iger Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 vom Harz abgespalten und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 21 mg (38.2 %); weißes Pulver.

Analyse: ($\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_7$, M = 591.67 g/mol);

MALDI-TOF-MS: $[\text{M}-\text{CF}_3\text{COO}]^+ = 479.3$ m/e.

Substanz 16: *Cycloheximid-N-ethansäureethylester-adamantylurethan*

140 mg (0.38 mmol) Cycloheximid-N-ethansäureethylester werden in 3 ml CH_2Cl_2 gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 67 mg (0.38 mmol) Adamantylisocyanat, 10 mg (0.18 mmol) NH_4Cl und 1 Tropfen CF_3COOH gegeben. Anschließend wird bei 30°C gerührt. Nach 4 h wird die Reaktionsmischung filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das ölige Produkt wird in 20 ml CHCl_3 /Essigester (2:1) aufgenommen. Die Lösung wird säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als stationäre Phase wird SiO_2 (230–400 mesh) verwendet. Als Laufmittel dient CHCl_3 / EE (2:1). Die Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 78 mg (37.7 %), weißes Pulver.

Analyse: ($\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_7$, M = 544.69 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 546.4$ m/e;

Ber.: C 66.15, H 8.14, N 5.14, Gef.: C 65.99, H 7.95, N 4.89%.

Substanz 17: *Cycloheximid-N-ethansäureethylester-2-bromethylurethan*

140 mg (0.38 mmol) Cycloheximid-N-ethansäureethylester werden in 3 ml CH_2Cl_2 gelöst. Zu der Lösung werden unter Rühren 57 mg (0.38 mmol) 2-Bromethylisocyanat, 10 mg (0.18 mmol) NH_4Cl und 1 Tropfen CF_3COOH gegeben. Anschließend wird bei 30°C gerührt. Nach 4 h wird die Reaktionsmischung filtriert und im Vakuum eingeeengt. Das ölige Produkt wird in 20 ml CHCl_3 /Essigester (2:1) aufgenommen. Die Lösung wird säulenchromatographisch aufgearbeitet. Als sta-

tionäre Phase wird SiO_2 (230-400 mesh) verwendet. Als Laufmittel dient CHCl_3 / EE (2:1). Die Fraktion wird im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 67 mg (34 %)

Analyse: ($\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{BrN}_2\text{O}_7$, $M = 517.49$ g/mol); MALDI-TOF-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 518.8$ m/e; Ber.: C 51.06, H 6.43, N 5.41, Gef.: C 51.23, H 6.71, N 5.27%.

Substanz 18: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure-ala-ala(OH)*

100 mg Chlorotriptyl-Harz (0.93 mmol/g, Fa. NovaBiochem), 87 mg (0.28 mmol) Fmoc-Ala(OH), 2 ml CH_2Cl_2 und 1 ml DIEA werden in 6 h bei RT umgesetzt. Anschließend werden 0.5 ml MeOH zugesetzt und nach 30 min wird dreimal mit je 1 ml CH_2Cl_2 . Danach wird 1 h mit 40%iger Piperidin-Lösung in DMF behandelt und dreimal mit je 1 ml NMP, i-PrOH, Ether gewaschen. Das Harz wird in 2 ml NMP aufgenommen. Dazu werden 87 mg (0.28 mmol) Fmoc-Ala(OH), 64 mg (0.42 mmol) HOBt und 46 μl (0.30 mmol) DIC gegeben. Nach 12 h schütteln bei RT wird filtriert. Mit 40%iger Piperidin-Lösung in DMF wird 1 h behandelt und dreimal mit je 1 ml NMP, i-PrOH, Ether gewaschen. Das Harz wird in 3 ml Aceton und 1 ml CH_2Cl_2 aufgenommen und 72 h bei 35°C mit 100 mg (0.36 mmol) Cycloheximid, 200 mg (1.45 mmol) K_2CO_3 und 20 mg (0.08 mmol) 18-Crown-6 umgesetzt. Anschließend wird zweimal mit je 3 ml Aceton. Das Harz wird in CH_2Cl_2 aufgenommen, abdekantiert, filtriert und dann weiter wie oben gewaschen. Die Substanz wird auf gewohnte Weise mit 5%iger Trifluoressigsäure in CH_2Cl_2 vom Harz abgespalten und im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 19 mg; weißes Pulver.

Analyse: ($M = 607.88$ g/mol); MALDI-TOF-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 609.3$ m/e.

Substanz 19: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure-val-ala(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Val(OH) und Fmoc-Ala(OH).

Ausbeute: 15 mg; weißes Pulver.

Analyse: ($M = 635.99$ g/mol); MALDI-TOF-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+ = 637.8$ m/e.

Substanz 20: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure—trp-ala(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Trp(OH) und Fmoc-Ala(OH).

Ausbeute: 17 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 723.02 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 725.0$ m/e.

Substanz 21: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure—ile-ala(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Ile(OH) und Fmoc-Ala(OH).

Ausbeute: 11 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 649.77 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 652.3$ m/e.

Substanz 22: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure—met-ala(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Met(OH) und Fmoc-Ala(OH).

Ausbeute: 9 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 667.91 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 670.5$ m/e.

Substanz 23: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure—gly-ala(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Gly(OH) und Fmoc-Ala(OH).

Ausbeute: 11 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 593.76 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 595.0$ m/e.

Substanz 24: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure—ala-val(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Ala(OH) und Fmoc-Val(OH).

Ausbeute: 7 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 635.99 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 638.2.0$ m/e.

Substanz 25: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure-val-val(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Val(OH) und Fmoc-Val(OH).

Ausbeute: 14 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 664.09 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 666.3$ m/e.

Substanz 26: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure-trp-val-(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Trp(OH) und Fmoc-Val(OH).

Ausbeute: 17 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 751.12 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 753.6$ m/e.

Substanz 27: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure-ile- val(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Ile(OH) und Fmoc-Val(OH).

Ausbeute: 12 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 678.07 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 680.1$ m/e.

Substanz 28: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure-met-val(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Met(OH) und Fmoc-Val(OH).

Ausbeute: 12 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 696.10 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 698.4$ m/e.

Substanz 29: *Cycloheximid-N- ω -undecansäure-gly-val(OH)*

Die Synthese erfolgte analog der Vorschrift für Substanz 18 ausgehend von Fmoc-Gly(OH) und Fmoc-Val(OH).

Ausbeute: 7 mg; weißes Pulver.

Analyse: (M = 621.96 g/mol); MALDI-TOF-MS: $[M+H]^+ = 623.9$ m/e.

BEISPIEL 2: Bestimmung der Inhibitionskonstanten der Derivate von Cycloheximid

Die Bestimmung von Inhibitionskonstanten von Cycloheximid und einigen Derivaten gegenüber der PPlase FKBP12 erfolgt mittels Protease-gekoppeltem PPlase-Assay

Puffer: 35 mM HEPES (pH 7.8), 1200 μ l

Substrat: Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-(4-) Nitroanilid (BACHEM)

Stammlösung 10 mg/ml in DMSO, Konzentration im Meßansatz 69.8 μ M

Hilfsprotease: α -Chymotrypsin (Rind), 400 U/mg protein, (MERCK),

Stammlösung 50 mg/ml, Konzentration im Meßansatz 1.7 mg/ml

Enzym: humanes FKBP12 (recombinant aus *E. coli*) Stammlösung 25 μ M,

Konzentration im Meßansatz 16 nM

Effektoren: Effektor-Stammlösung 10 mg/ml in Ethanol, Konzentration im Meßansatz

zwischen 1000 und 0.01 μ M

Temperatur: 10°C.

Die Effektoren wurden im Inkubationsansatz 5 min vorinkubiert, die Reaktion wurde unmittelbar darauf durch Zugabe von 10 μ l der Hilfsprotease gestartet.

Meßinstrument: Hewlett Packard UV/VIS Spektrophotometer HP 8452A,

Wellenlänge 390 nm

Die kinetische Analyse erfolgte mittels „SigmaPlot“ (Scientific Graphing System Vers. 2.0, Jandel Corp.)

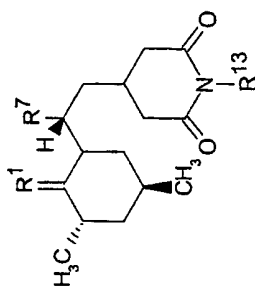
Abbildung 1 zeigt exemplarisch die Inhibierungskinetik für 5 entsprechend Beispiel 2. Typische Inhibitionskonstanten sind in den Tabellen 1 und 2 aufgeführt.

BEISPIEL 3: Zytotoxizitätsmessung der Cycloheximid-Derivate

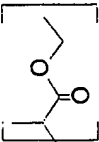
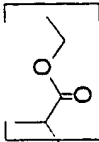
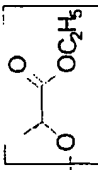
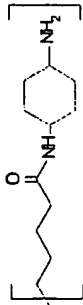
Erfindungsgemäße Verbindungen lassen sich anhand ihrer toxischen Effekte auf eukaryotische Zellen klassifizieren. Zur Klassifizierung im eukaryotischen Zellassay sind solche Zellen besonders gut geeignet, die durch die Zugabe von Cycloheximid absterben. Die Charakterisierung der zytotoxischen Eigenschaften der entdeckungsgemäßen Verbindungen erfolgte mit den CHX-sensitiven Standardzelllinien HeLa, Mausfibroblasten L-929 und Humanleukämiezellen K-562. Zur Quantifizierung des Einflusses von CHX oder seiner Derivate auf den Zellassay wird diejenige Wirkstoffkonzentration bestimmt, die zu einem Absterben von 50% der Zellen führt (IC_{50}). Die Klassifizierung der Verbindungen entsprechend ihrer Zytotoxizität wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen:

sehr hoch:	$IC_{50} <$	5 μ g/ml
hoch:	$IC_{50} =$	50 - 5 μ g/ml
mäßig:	$IC_{50} =$	50 - 100 μ g/ml
mäßig/gering:	$IC_{50} =$	100 - 200 μ g/ml
gering/nicht:	$IC_{50} >$	200 μ g/ml

Tabelle 1:



Verbindung	R ¹	R ⁷	R ¹³	Zytotoxizität	rhFKBP12-Inhibierung K _i /IC ₅₀ (μM)
Cycloheximid (CHX)	=O	-OH	-H	sehr hoch	K _i = 3.9
CHX-Oxim	=NOH	-OH	-H	mäßig/gering	IC ₅₀ = 177.0
O-Acetyl-CHX	=O	-OCH ₃ C	-H	hoch	IC ₅₀ >> 200
N-Methyl-CHX	=O	-OH	-CH ₃	nicht/gering	IC ₅₀ = 124.1
N-Benzyl-CHX	=O	-OH	-CH ₂ C ₆ H ₅	mäßig/gering	IC ₅₀ = 116.7
N-Valyl-CHX	=O	-OH		nicht/gering	IC ₅₀ = 151.0

<u>1</u>	..O		$-\text{C}_3\text{H}_6\text{COOC}_2\text{H}_5$	mäßig/gering	$K_i = 22.8$
<u>3</u>	..O	$-\text{OH}$	$-\text{C}_3\text{H}_6\text{CN}$..hoch	$K_i = 50.6$
<u>4</u>	=O	..OH	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CN}$..hoch	$\text{IC}_{50} = 68.2$
<u>4</u>	..O	$-\text{OH}$	$-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	mäßig/gering	$K_i = 4.1$
<u>5</u>	=O	$-\text{OH}$	$-\text{CH}_2\text{CONH}_2$..hoch	$K_i = 21.9$
<u>7</u>	..O	$-\text{OH}$	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{COOC}_2\text{H}_5$	N.D.	$\text{IC}_{50} = 60.2$
<u>10</u>	=O	..OH		N.D.	$\text{IC}_{50} = 129.6$
<u>11</u>	=O	$-\text{OH}$			
<u>13</u>	=O			N.D.	$\text{IC}_{50} = 85.1$
<u>15</u>	=O	$-\text{OH}$	$-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$	nicht/gering	$\text{IC}_{50} = 151.0$

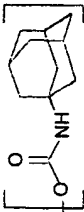
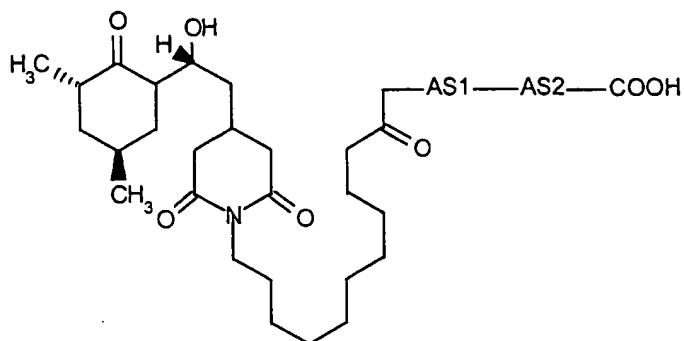
<u>16</u>	=O		-C ₃ H ₆ NH ₂	N.D.	IC ₅₀ >>200
<u>32</u>	=O	-OH		N.D.	IC ₅₀ >>200

Tabelle 2:



Verbin- dung	AS1	AS2	Zytotoxizität	rhFKBP12- Inhibierung IC ₅₀ (μM)
<u>18</u>	Alanin	Alanin	Mäßig/gering	IC ₅₀ = 110.4
<u>19</u>	Valin	Alanin	Mäßig/gering	IC ₅₀ = 160.6
<u>20</u>	Tryptophan	Alanin	Nicht/gering	IC ₅₀ = 29.4
<u>21</u>	Isoleucin	Alanin	Nicht/gering	IC ₅₀ = 43.7
<u>22</u>	Methionin	Alanin	Nicht/gering	IC ₅₀ = 41.4
<u>23</u>	Glycin	Alanin	Nicht/gering	IC ₅₀ = 173.8
<u>24</u>	Alanin	Valin	Nicht/gering	IC ₅₀ = 95.1
<u>25</u>	Valin	Valin	Nicht/gering	IC ₅₀ = 48.4
<u>26</u>	Tryptophan	Valin	Mäßig/gering	IC ₅₀ = 16.8
<u>27</u>	Isoleucin	Valin	Mäßig/gering	IC ₅₀ = 77.0
<u>28</u>	Methionin	Valin	Mäßig/gering	IC ₅₀ = 22.8
<u>29</u>	Glycin	Valin	Nicht/gering	IC ₅₀ = 48.3

Zytotoxizitäten ausgewählter Verbindungen sind in den Tabellen 1 und 2 zusammengefaßt.

BEISPIEL 4: Nervenzellregenerative Wirkung von Cycloheximid-Derivaten:

Die erfindungsgemäßen Verbindungen lassen sich auch anhand ihrer Wirkung auf die Regeneration des Nervus ischiadicus von Ratten charakterisieren. Dazu wurden vier Monate alte weibliche Albino-Ratten (Han:WIST) in einen Ätherrausch versetzt und entsprechend ihrem Körpergewicht mit Rompun (16 mg/kg) und Ketavet (125 mg/kg) in Kombination intramuskulär narkotisiert. Der Nervus ischiadicus wurde nach einem Hautschnitt präpariert, vor der Auftrennung in seine distalen Äste durchtrennt und anschließend mikrochirurgisch durch drei epineurale Nervennähte in seiner Kontinuität wiederhergestellt. Die Naht wurde mit BASIC (bacterial synthesized cellulose) ummantelt. Das Material übt gleichzeitig eine Depotfunktion für die unmittelbar nach der Operation einmalig auf die Läsionsstelle applizierten Testsubstanzen aus. Beispielhaft für die entdeckungsgemäßen Verbindungen wurde Cycloheximid-N-ethansäureethylester 5 in 10% DMSO/H₂O gelöst und in Dosen von 30 (n=4/7) und 60 (n=3) mg/kg Ratte in 50 µl Lösungsmittel am Tiermodell getestet. Als Negativkontrolle (n=3/6) wurden entsprechende Dosen des Dipeptids Ala-Ala-OH verwendet. Als Positivkontrolle diente der FKBP-Inhibitor FK506 (1mg/kg; n=3), dessen neuroregenerative Wirkung bereits beschrieben wurde. Der Hautverschluß erfolgte mittels fortlaufender Naht.

In einem Zeitraum von 10 Wochen wurden die Tiere einer wöchentlichen Begutachtung des Gangverhaltens unterzogen. Die Bewertung wurde nach folgenden Kriterien vorgenommen:

- Koordination der Beinbewegung
- Belastung/Schonung des operierten Beines
- Belastungsschwerpunkt (Fußzehen-/fersenbelastung)

- Zehenstellung
- Beweglichkeit des Fußes und der Zehen (z.B. Versteifung)

Dabei erfolgte jeweils eine Einschätzung des Zustandes des operierten Beines durch Punktvorgabe: -1 (negativ), 0 (unauffällig) und +1 (positiv). Die Punkte wurden nach Versuchsablauf verrechnet.

Nach 10 Wochen wurde das nach Versuchsprotokoll vorgesehene Tier erneut narkotisiert und der M. ext. digit. longus sowie der N. peroneus profundus und der N. ischiaticus im Bereich der Ummantelung zur Präparategewinnung entfernt. Zusätzlich wurden für einen direkten Vergleich die entsprechenden Präparate der Gegenseite gewonnen. Die entnommenen Muskeln wurden gewogen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und in 30 µm dicke Serienschnitte (FRIGOCUT) geschnitten. Die histologische Auswertung der Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch nach Acetylthiocholinjodid-Färbung. Die entnommenen Nervenstücke wurden histologisch aufgearbeitet und die erhaltenen Querschnittpräparate lichtmikroskopisch ausgewertet (Myelinisierung, neuromuskuläre Endplatten).

Tabelle 3

Substanz	Bewertung des Gangverhaltens (Punkte)	Muskelgewicht des operierten Beines (% des gesunden Beines)
Ala-Ala-OH	7	63.8 ± 2.8
<u>5</u>	8	78.9 ± 3.1
FK506	14	75.3 ± 7.7

Die Ergebnisse der Begutachtung des Gangverhaltens der Versuchstiere und des Vergleichs des Gewichtes der M. ext. digit. longi sind in Tabelle 3 exemplarisch für die Substanz 5 bei einer applizierten Dosis von 30 mg/kg dargestellt.

Referenzen:

- ¹ Fischer, G., C. Mech, und H. Bang (1984) Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis/trans Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. Biomed. Biochim. Acta 43, 1101-1111
- ² Fischer, G. (1994) Peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases and their effectors. Angew. Chem. Int. Ed. 33, 1415-1436
- Galat, A., and S. M. Metcalfe (1995) Peptidylproline *cis/trans* isomerases, Prog. Biophys. Molec. Biol. 63, 67-118
- Kay, J. E. (1996) Structure-function relationships in the FK506-binding protein (Fkbp) family of peptidylprolyl *cis-trans* isomerases. Biochem. J. 314, 361-385
- ³ Bierer, B. E. (1995) Mechanisms of action of immunosuppressive agents - cyclosporin A, FK506, and rapamycin. Proc. Assoc. Am. Phys. 107, 28-40
- ⁴ Snyder, S. H., D. M. Sabatini, M. M. Lai, J. P., Steiner, G. S. Hamilton, and P. D. Suzdak (1998) Neural actions of immunophilin ligands. TIPS 19, 21-26
- Gold B. G. (1997) FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. Molec. Neurobiol. 15, 285-306
- ⁵ Lopez-Illasaca, M., C. Schiene, G. Küllertz, T. Tradler, G. Fischer, and R. Wetzker (1998) Effects of FK506-binding protein 12 and FK506 on autophosphorylation of epidermal growth factor receptor, J. Biol. Chem. 273, 9430-9434
- ⁶ Küllertz, G., S. Lütke, and G. Fischer (1998) Semi-automated microtiter plate assay for monitoring peptidyl-prolyl-*cis/trans* isomerase activity in normal and pathological human sera. Clin. Chem. 44, 502-508
- ⁷ Janowski, B., S. Wöllner, M. Schutkowski, and G. Fischer (1997) A protease-free assay for peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases using standard peptide substrates. Analyt. Biochem. 252, 299-307

- ⁸ Scholz, C., J. Rahfeld, G. Fischer, and F. X. Schmid (1997) Catalysis of protein folding by parvulin. *J. Molec. Biol.* 273, 752-762
- ⁹ Brandsch, M., F. Thunecke, G. Küllertz, M. Schutkowski, G. Fischer, and K. Neubert (1998) Evidence for the absolute conformational specificity of the intestinal H⁺/peptide symporter, PEPT1. *J. Biol. Chem.* 273, 3861-3864
- ¹⁰ Kern, D., G. Kern, G. Scherer, G. Fischer, and T. Drakenberg (1995) Kinetic analysis of cyclophilin-catalyzed prolyl *cis/trans* isomerization by dynamic NMR spectroscopy. *Biochemistry* 34, 13594-13602
- ¹¹ Übliche Methoden der K_i-Wertermittlung
- ¹² Suthanthiran, M., R. E. Morris, and T. B. Strom (1996) Immunosuppressants - cellular and molecular mechanisms of action. *Am. J. Kidney Diseases* 28, 159-172
- Mignat, C. (1997) Clinically significant drug interactions with new immunosuppressive agents. *Drug Safety*. 16, 267-278
- Galat, A., and S. M. Metcalfe (1995) Peptidylproline *cis/trans* isomerases. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 63, 67-118
- ¹³ Lost, J. L., L. A. Kominek, G. S. Hyatt, and H. Y. Wang (1984) Cycloheximide: properties, biosynthesis, and fermentation; VanDamme E.J (Ed.), *Drugs and Pharmaceutical Sciences* 22, 531-550
- ¹⁴ Jackson, L. G., and G. P. Studzinski (1968) Autoradiographic studies of the effects of inhibitors of protein synthesis on RNA synthesis in HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 52, 408-418
- ¹⁵ Hardesty, B., T. Oberg, J. Irvin, and W. Culp (1973) The effect of sodium fluoride, edeine, and cycloheximide on peptide synthesis with reticulocyte ribosomes. *Basic Life Sci.* 1, 377-392; Oberg, T. G., W. J. Culp, W. L. McKeethan, and B. Hardesty (1971) The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* 246, 174-181
- ¹⁶ Mizuno, S., A. Ishii, Y. Murakami, and H. Akagawa (1997) Stress dose-dependent suppression of heat shock protein gene expression by inhibiting protein synthesis during heat shock treatment. *Cell Struct. Funct.* 22, 7-13
- ¹⁷ Imanishi, S., K. Hashizume, H. Kojima, A. Ichihara, and K. Nakamura (1998) An mRNA of tobacco cell, which is rapidly inducible by methyl jasmonate in the pre-

sence of cycloheximide, codes for a putative glycosyltransferase. *Plant Cell Physiol.* 39, 202-211

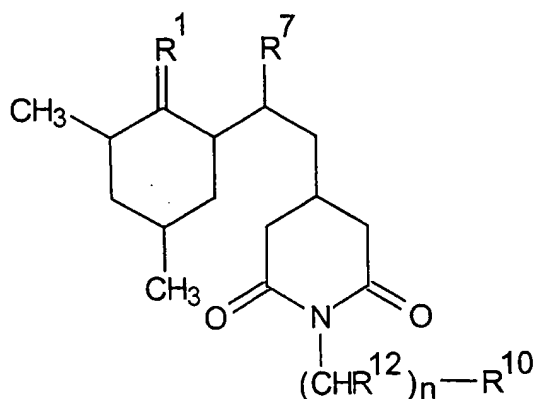
¹⁸ Castagne, V., and P. G. H. Clarke (1997) Inhibition of glutathione synthesis can enhance cycloheximide-induced protection of developing neurons against axotomy. *Brain Research. Developm. Brain Res.* 102, 285-290

¹⁹ Kharlamov, A., J. Y. Joo, T. Uz, and H. Manev (1997) Cycloheximide reduces the size of lesion caused in rats by a photothrombotic model of brain injury. *Neurolog. Res.* 19, 92-96

²⁰ Sanchez, A., A. M. Alvarez, M. Benito, and I. Fabregat (1997) Cycloheximide prevents apoptosis, reactive oxygen species production, and glutathione depletion induced by transforming growth factor beta in fetal rat hepatocytes in primary culture. *Hepatology.* 26, 935-943

Patentansprüche

1. Cycloheximid-Derivat der allgemeinen Formel (1):



in der

n eine ganze Zahl von 1 bis 20 bedeutet,

jedes R^{12} unabhängig ein Wasserstoffatom oder einen Alkylrest bedeutet,

R^1 aus einem Sauerstoffatom, einem Schwefelatom oder den Gruppen NR^2 , NOR^2 und $N-NR^2R^3$ ausgewählt wird, wobei

R^2 und R^3 unabhängig voneinander ein Wasserstoffatom, CH_3 , einen Arylrest, einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit R^6 oder R^{10} substituierten Aryl- oder Cycloalkylrest, einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit R^6 oder R^{10} substituierten Heterocycloalkyl- oder Heteroarylrest, bei denen ein oder mehrere Kohlenstoffatome im Ring durch O, S oder NR^5 ersetzt sind oder einen Rest $-A-X-B$ darstellen, oder

R^2 und R^3 zusammen einen Alkylrest darstellen, der mit dem Stickstoffatom, an das sie gebunden sind, einen 3- bis 5-gliedrigen Ring bilden, der gegebenenfalls einen oder mehrere Substituenten R^6 aufweist, wobei gegebenenfalls ein oder mehrere Kohlenstoffe des Alkylrestes durch $-O-$, $-$

S-, -NR⁵-, Cycloalkylen, Heterocycloalkylen, Arylen oder Heteroarylen ersetzt sind, wobei

R⁵ ein Wasserstoffatom, einen Alkylrest oder einen Arylrest darstellt,

R⁸ für Alkyl, Aryl, OR⁵, C(O)OR⁵, CN oder ein Halogenatom steht und R⁵ wie vorstehend definiert ist, A einen Alkylrest und B einen Alkylrest darstellt,

X für -O-, -S-, -NR⁵-, Cycloalkylen, Heterocycloalkylen, Arylen, Heteroarylen oder eine Einfachbindung steht und R⁵ wie vorstehend definiert ist,

R⁷ einen Rest -OH, -OR⁹, -OC(O)R⁹, -OC(S)R⁹, -OC(O)NHR⁹, -OC(S)NHR⁹ oder O(CHR¹²)_nR¹⁰ darstellt, wobei

R⁹ einen gegebenenfalls ein- oder mehrfach mit R⁶ substituiertes Aryl- oder Heteroarylrest, bei dem ein oder mehrere Kohlenstoffatome im Ring durch O, S oder NR⁵ ersetzt sind, oder einen Rest -A-X-B darstellt, wobei A, B, X, R⁵ und R⁶ wie vorstehend definiert sind, und

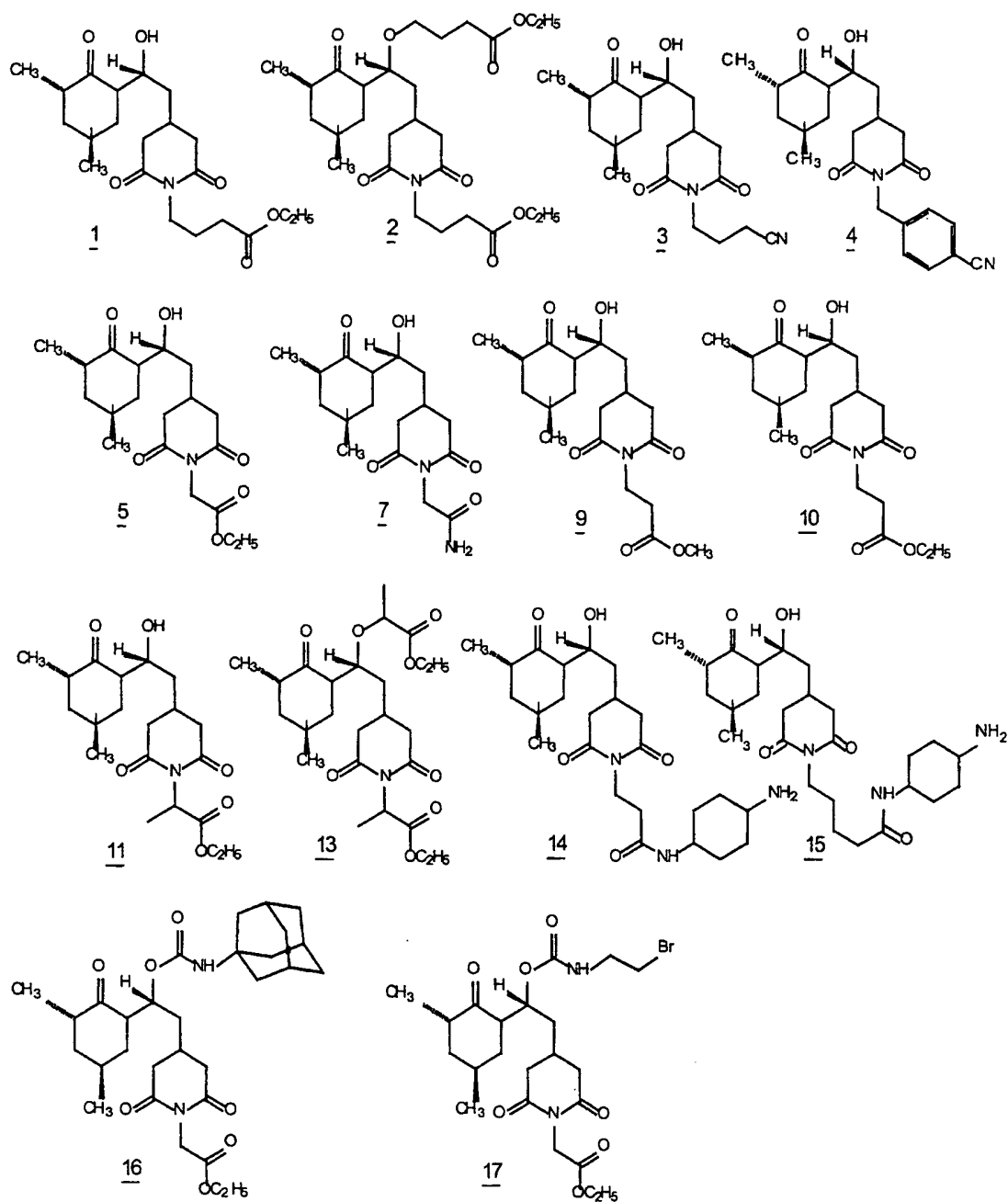
R¹⁰ einen Rest -NHR², -NR²R³, -C(O)OR², -C(S)OR², -C(O)NR²R³, -CN, -NR²C(O)NR²R³, -OC(O)NR²R³, -NR²C(S)NR²R³, -OC(S)N R²R³ oder -C(O)NHR¹¹ darstellt, wobei R² und R³ wie vorstehend definiert sind und R¹¹ für einen Aminosäurerest oder Oligopeptidrest steht, oder ein pharmazeutischverträgliches Salz davon.

2. Verbindung nach Anspruch 1, nämlich eine Verbindung der Formel (1) für die gilt

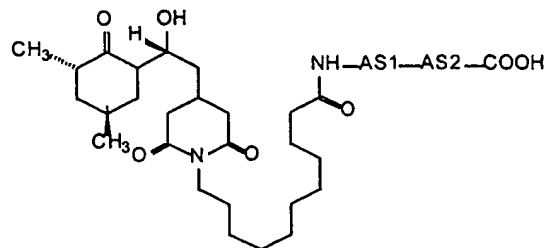
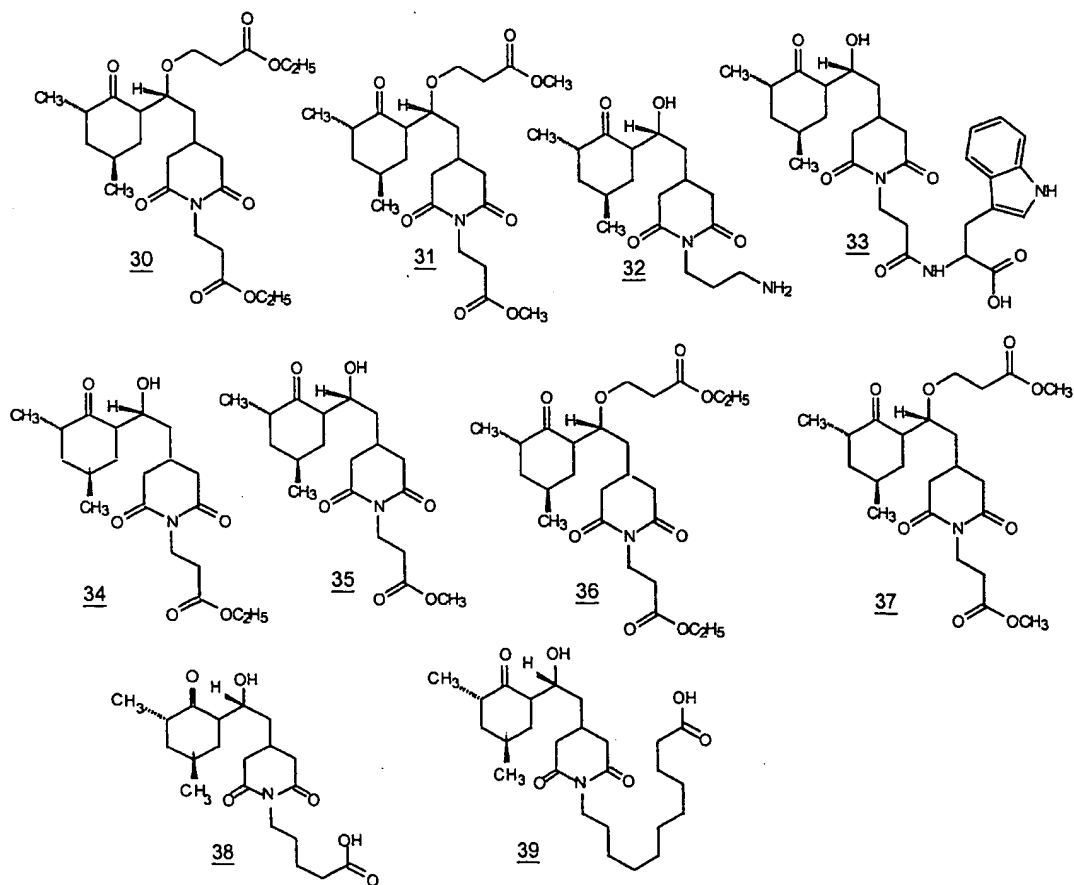
- (a) $n = 1, 2, 3$; R¹ = O; R⁷ = OH, O(CHR¹²)_nR¹⁰, OC(O)CH₃; R¹⁰ = C(O)OCH₃, C(O)OC₂H₅, CN, C(O)NH₂; R¹² = H, CH₃, C₂H₅; oder
- (b) $n = 3-10$; R¹ = O; R⁷ = OH; R¹⁰ = C(O)NHR¹¹, R¹¹ = Aminosäurerest, Oligopeptidrest; R¹² = H, CH₃, C₂H₅; oder
- (c) $n = 1, 2, 3$; R¹ = O; R⁷ = OH, O(CHR¹²)_nR¹⁰; R¹⁰ = C(O)OCH₃, C(O)OC₂H₅, CN, C(O)NH₂; R¹² = H, CH₃, C₂H₅; oder
- (d) $n = 1, 2, 3$; R¹ = NOH, N-NHPh, N-NHCH₃, N-Alkyl, N-Benzyl; R⁷ = OH, O(CHR¹²)_nR¹⁰; R¹⁰ = C(O)OCH₃, C(O)OC₂H₅, CN, C(O)NH₂; R¹² = H, CH₃, C₂H₅; oder

- (e) $n = 1, 2, 3$; $R^1 = O$; $R^7 = OH, O(CHR^{12})_n R^{10}, OC(O)NH\text{-Alkyl}, OC(O)NH\text{-Cycloalkyl}, OC(O)NH\text{-Aryl}$; $R^{10} = C(O)OCH_3, C(O)OC_2H_5, CN, C(O)NH_2$; $R^{12} = H, CH_3, C_2H_5$.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 mit der Formel:



Verbindung	Aminosäurerest AS1	Aminosäurerest AS2
<u>18</u>	Alanin	Alanin
<u>19</u>	Valin	Alanin
<u>20</u>	Tryptophan	Alanin
<u>21</u>	Isoleucin	Alanin
<u>22</u>	Methionin	Alanin
<u>23</u>	Glycin	Alanin
<u>24</u>	Alanin	Valin
<u>25</u>	Valin	Valin
<u>26</u>	Tryptophan	Valin
<u>27</u>	Isoleucin	Valin
<u>28</u>	Methionin	Valin
<u>29</u>	Glycin	Valin

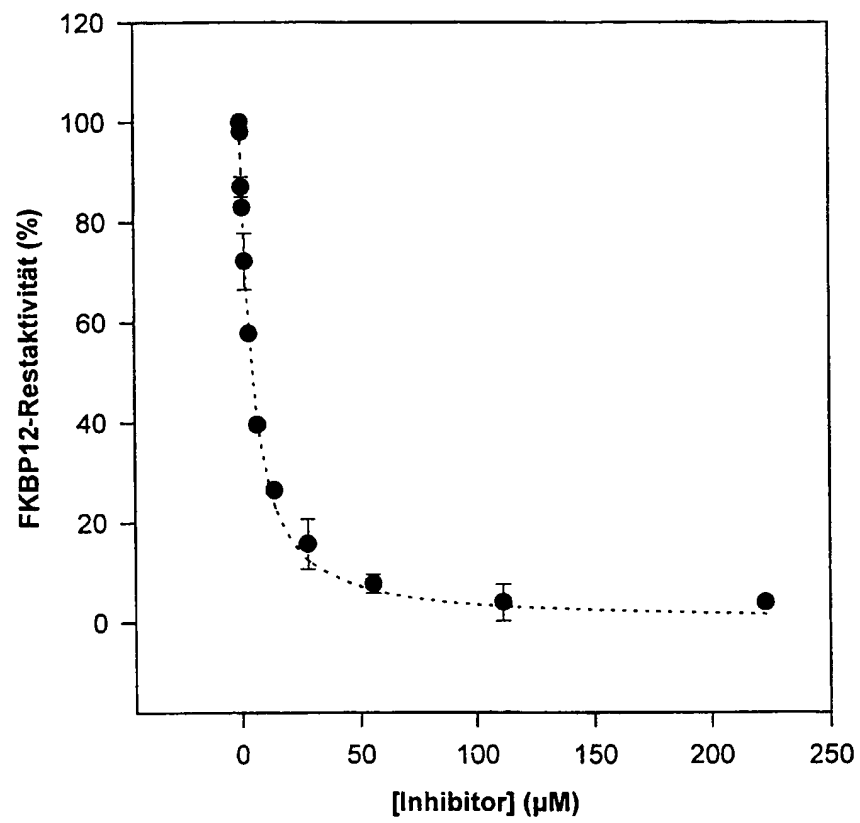
Verbindung 18-29

4. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, mit einem Molekulargewicht kleiner als etwa 2000 g/Mol, vorzugsweise kleiner als 1000 g/Mol.
5. Verbindung nach Anspruch 4, wobei das Molekulargewicht kleiner als etwa 750 g/Mol ist.
6. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, welche die Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase Aktivität des FK506 bindenden Proteins inhibieren kann.
7. Arzneimittel enthaltend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 und gegebenenfalls einen pharmazeutisch verträglichen Träger.
8. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Regeneration von Nerven.
9. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von beschädigtem Nervengewebe.
10. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 umfassend die Umsetzung von Cycloheximid oder eines Derivates an einem polymeren Träger.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der polymere Träger Chlorotrityl-Harz ist.
12. Verwendung einer Verbindung mit einer Affinität zu FK506 bindendem Protein, einem Molekulargewicht kleiner 2000 g/Mol, welche die Peptidylprolyl *cis/trans* Isomerase Aktivität des FK506 bindenden Proteins inhibie-

ren kann zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von beschädigtem Nervenzellgewebe.

1 / 1

Fig. 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/08267

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D211/88 A61K31/45 C07K5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07D C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199204 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 1992-030619 XP002131940 -& JP 03 279327 A (TSUMURA & CO), 10 December 1991 (1991-12-10) abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-9



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 March 2000

Date of mailing of the international search report

124.03.00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Fink, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/EP 99/08267

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 57, no. 7, 1 October 1962 (1962-10-01) Columbus, Ohio, US; PETTIT G R ET AL: "Actidione acetate nitrogen mustard" column 8407e; XP002131939 abstract & CHEMISTRY AND INDUSTRY. CHEMISTRY AND INDUSTRY REVIEW., 1962, page 1016 ISSN: 0009-3068 ---	1
P,X	CHRISTNER C ET AL: "Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Cycloheximide Derivatives as Potential Inhibitors of FKBP12 with Neuroregenerative Properties" J. MED. CHEM. , vol. 42, no. 18, 9 September 1999 (1999-09-09), pages 3615-3622, XP002131938 the whole document -----	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 99/08267

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 12 (in part)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

See supplemental sheet Additional Matter PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Additional matter PCT/ISA/210

Claim No. 12 (in part)

Patent Claim No. 12 relates to the use of chemical compounds which are solely defined by the following parameters:

- (1) They must have an affinity to an FK506 binding protein,
- (2) must comprise a mole weight of less than 2000 g/mol, and
- (3) must inhibit the peptidylprolyl cis/trans isomerase activity of the FK506 binding protein.

The use of these parameters appears, in the given context, to lack clarity under the terms of PCT Article 6 (said chemical compounds can also not be defined with regard to their structure). This absence of clarity is such that it makes it impossible to conduct a meaningful and complete search (it is impossible to compare the parameters selected by the applicant with that which discloses the prior art). For this reason, Claim No. 12 was only searched to the extent that the compounds according to Claim No. 1 are concerned.

The applicant is therefore advised that patent claims or sections of patent claims laid to inventions for which no international search report was drafted normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). Similar to the authority entrusted with the task of carrying out the international preliminary examination, the EPO also does not generally carry out a preliminary examination of subject matter for which no search has been conducted. This is also valid in the case when the patent claims have been amended after receipt of the international search report (PCT Article 19), or in the case when the applicant submits new patent claims pursuant to the procedure in accordance with PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internal Application No	
-------------------------	--

PCT/EP 99/08267

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 3279327 A	10-12-1991	JP 2817334 B	30-10-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Sonstiges Aktenzeichen

PCT/EP 99/08267

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07D211/88 A61K31/45 C07K5/06

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07D C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 199204 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B02, AN 1992-030619 XP002131940 - & JP 03 279327 A (TSUMURA & CO), 10. Dezember 1991 (1991-12-10) Zusammenfassung</p> <p style="text-align: center;">— — — — — -/-</p>	1-9



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindeterischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. März 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

24.03.00

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5816 Patentleien 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Fink, D

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. ionaler Aktenzeichen

PCT/EP 99/08267

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 57, no. 7, 1. Oktober 1962 (1962-10-01) Columbus, Ohio, US; PETTIT G R ET AL: "Actidione acetate nitrogen mustard" Spalte 8407e; XP002131939 Zusammenfassung & CHEMISTRY AND INDUSTRY. CHEMISTRY AND INDUSTRY REVIEW., 1962, Seite 1016 ISSN: 0009-3068</p>	1
P,X	<p>CHRISTNER C ET AL: "Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Cycloheximide Derivatives as Potential Inhibitors of FKBP12 with Neuroregenerative Properties" J. MED. CHEM., Bd. 42, Nr. 18, 9. September 1999 (1999-09-09), Seiten 3615-3622, XP002131938 das ganze Dokument</p>	1-12

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/08267

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr. **12 (teilweise)**
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. ☐ Ansprüche Nr. _____
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. _____

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 12 (teilweise)

Der vorliegende Patentanspruch 12 bezieht sich auf die Verwendung von chemischen Verbindungen die

lediglich durch folgende Parameter definiert sind:

(1) Sie müssen eine Affinität zu FK506 bindendem Protein besitzen,

(2) ein Molgewicht kleiner als 2000 g/Mol aufweisen, und

(3) die Peptidylprolyl

cis/trans Isomerase Aktivität des FK506 bindenden Proteins inhibieren.

Die Verwendung dieser Parameter muss im gegebenen Zusammenhang als ein Mangel an Klarheit im Sinne von Art. 6 PCT angesehen werden (die besagten chemischen Verbindungen können auch über ihre Struktur definiert werden). Der Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle vollständige Recherche unmöglich macht (es ist unmöglich, die vom Anmelder gewählten Parameter mit dem zu vergleichen, was der Stand der Technik hierzu offenbart). Daher wurde der vorliegende Anspruch 12 nur so weit recherchiert, als davon die Verbindungen gemäss vorliegendem Anspruch 1 betroffen sind.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/08267

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 3279327 A	10-12-1991	JP 2817334 B	30-10-1998